Untersuchungen zur Biosynthese des Pyrimidinteils des Thiamins

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Wolf Heinrich Strätling
aus Paderborn

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0020

Untersuchungen zur Biosynthese des Pyrimidinteils des Thiamins

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Wolf Heinrich Strätling
aus Paderborn

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 1969

Dekan: Prof. Dr. A. Seilacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lingens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. F. Lingens

im Chemischen Institut der Universität Tübingen

und im Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

der Universität Hohenheim (L.H.) angefertigt.

Für die vielen wertvollen Anregungen, die großzügige

Förderung und die mir gewährte Freizügigkeit möchte

ich Herrn Prof. Dr. F. Lingens ganz herzlich danken.

Dem Direktor des Chemischen Instituts in Tübingen,

Herrn Prof. Dr. E. Müller,

danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Übersicht über die bisherigen Untersuchungen zur Thiaminbiosynthese	1
1. Biologisches	1
2. Kondensation des Pyrimidinteils mit dem Thiazolteil	2
3. Biosynthese des Pyrimidinteils	10
4. Biosynthese des Thiazolteils	22
5. Regulation	29
6. Genetik	31
B. Problemstellung	33
C. Methoden	34
1. Materialien	34
2. Geräte und gängige Methoden	35
3. Medien	37
4. Organismen	38
5. Klassifizierung der Mutanten	39
6. Kreuzfütterungsversuche	40
7. Akkumulationsversuche	40
8. Versuche zur Repression der Biosynthese des Pyrimidinteils durch Thiamin bei E. coli	45
9. Enzymatische Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der gefundenen Pyrimidinderivate	46
10. Darstellung und enzymatische Umsetzung des 4-Amino-imidazol-ribonucleotids	49
11. Akkumulationsversuche mit der Mutante HK 210 von S. cerevisiae	52
D. Ergebnisse und Diskussion	53
1. Klassifizierung der Mutanten	53

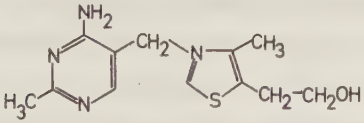
2. Kreuzfütterungsversuche 56
3. Akkumulation der Pyrimidinderivate 59
a. Akkumulationsversuche mit der Mutante N 174 von S. cerevisiae 59
b. Akkumulationsversuche mit Thiazolmutanten von S. cerevisiae 59
c. Akkumulationsversuche mit der Thiazolmutante L 218 von E. coli 60
d. Spektroskopische Analyse 74
4. Zur Regulation der Biosynthese des Pyrimidinteils 82
5. Enzymatische Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der gefundenen Pyrimidinderivate 84
6. Darstellung des 4-Amino-imidazol-ribonucleotids 89
7. Enzymatische Umwandlung des 4-Amino-imidazol-ribonucleotids in den Pyrimidinteil 92
8. Untersuchungen zum Akkumulationsprodukt der P2-Mutante HK 210 von S. cerevisiae 94
E. Zusammenfassung 96
F. Literaturverzeichnis 99

A. Übersicht über die bisherigen Untersuchungen zur Thiaminbiosynthese.

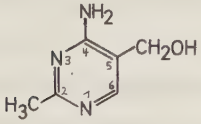
Zu Beginn der vorliegenden Arbeit soll dargestellt werden, was bisher über die Biosynthese des Thiamins bekannt ist. Der letzte umfassendere referierende Artikel zu diesem Thema stammt aus dem Jahre 1963 [1]. Da seitdem eine Fülle wichtiger Publikationen erschienen ist, scheint es sinnvoll, besonders auf die jüngsten Arbeiten zur Thiaminbiosynthese einzugehen.

1. Biologisches.

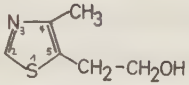
Die Bausteine des Thiaminmoleküls (I) sind ein Pyrimidinring und ein Thiazolring. Schon bald nach der Strukturaufklärung durch Williams und Mitarbeiter in den Jahren 1934 - 1937 wurde vermutet, daß das Thiamin durch "Zusammenfügung" eines Pyrimidin- und eines Thiazolderivates biosynthetisiert wird.



I



II



III

Viele Organismen benötigen Thiamin als essentiellen Wachstumsfaktor. Genauere Untersuchungen konnten diese in vier Gruppen

einteilen, je nachdem, ob sie (1) Thiamin, (2) 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin (II), im folgenden kurz als Hydroxymethylpyrimidin oder Pyrimidinteil bezeichnet, (3) 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol (III), im folgenden kurz als Thiazolteil bezeichnet, oder (4) 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin und 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol zum Wachstum benötigen [2-6]. In dieselben vier Kategorien können die thiaminbedürftigen Mutanten ursprünglich autotropher Mikroorganismen eingeordnet werden. Isolierte Wurzelkulturen der meisten höheren Pflanzen benötigen Thiamin als essentiellen Wachstumsfaktor [7]. Jedoch gibt es auch hier Ausnahmen, die wiederum in die oben genannten Gruppen eingeteilt werden können, je nachdem ob sie den Thiazolteil [8,9], den Pyrimidin- und Thiazolteil [8,10], oder keinen Bestandteil des Thiamins [11,9,12,13] zum Wachstum benötigen.

2. Kondensation des Pyrimidinteils mit dem Thiazolteil.

Der erste direkte Nachweis, daß der Pyrimidinteil ins Thiamin eingebaut wird, stammt von Korte und seinen Mitarbeitern. Er synthetisierte 2-Methyl-4-amino-5-amino-^{14}C-methyl-pyrimidin und konnte zeigen, daß dieses von thiaminbedürftigen Pilzen und Hefen in Thiamin eingebaut wird [14]. Ebenso wird 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol-2-^{14}C in Thiamin eingebaut, aber nicht 4-Methyl-thiazol-2-^{14}C [15], von dem Nakayama [16] aufgrund der wachstumsfördernden Wirkung bei Thiazolmutanten von E. coli und Neurospora crassa annahm, daß es ein Zwischenprodukt der Biosynthese des Thiazolteils ist. 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin kann in das eigentliche Zwischenprodukt der Thiaminbiosynthese, das 5-Hydroxymethylderivat, umgewandelt werden [17]. Bei Inkubation der 5-Aminomethylverbindung (zusammen

mit dem Thiazolteil) mit einem rohen Enzymextrakt aus Bäckerhefe wurde Thiamin synthetisiert, und nach Inkubation ohne Thiazolteil konnte durch chromatographische Analyse das 5-Hydroxymethylderivat gefunden werden.

Zum ersten Mal haben Harris und Yavit [18] mit Hilfe eines zellfreien Enzymextraktes aus Bäckerhefe eine enzymatische Synthese von Thiamin aus II, III und ATP nach einer lag-Phase von mehreren Stunden nachweisen können. Da mit 2-Methyl-4-amino-4-phosphorylmethylpyrimidin als Substrat (neben dem Thiazolteil) die Thiaminsynthese größer als mit II ist und die lag-Periode verschwindet, nahmen die Autoren an, daß das Phosphorylderivat von II das eigentliche Substrat der Kondensationsreaktion ist.

Leder [19] konnte mit gereinigten Enzymextrakten zeigen, daß auch mit dem Phosphorylderivat von II die Reaktion noch ATP benötigt. Eine eingehende Analyse der Produkte des Inkubationsansatzes [20] durch enzymatischen Abbau mit Takadiastase, Prüfung auf Thiaminpyrophosphat mit Hilfe der Transketolasereaktion, Papierchromatographie, Papierelektrophorese, Ionenaustauschchromatographie und quantitative Phosphatanalyse zeigte, daß das Reaktionsprodukt Thiaminmonophosphat ist. Daraus schlossen die Autoren, daß das Thiazolmonophosphat das eigentliche zweite Substrat darstellt. Aber erst das Pyrimidinpyrophosphat mit dem Thiazolmonophosphat als Cosubstrat eliminiert die ATP-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion. Diese Untersuchungen führten zur richtigen Formulierung der Kondensationsreaktion:

Py-P-P + Th-P ⟶ Thiaminmonophosphat + Pyrophosphat

Sich anschließende Untersuchungen anderer Autoren bestätigten diese Ergebnisse und erzielten die Aufklärung der davorliegenden sowie folgenden enzymatischen Reaktionen [21-30]. Ihre Ergebnisse lassen sich in der Formulierung des letzten Teils der Biosynthese des Thiaminpyrophosphates durch sechs enzymatische Reaktionen zusammenfassen.

2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin + ATP $\xrightarrow{Mg^{++}}$ 2-Methyl-4-amino-5-phosphorylmethyl-pyrimidin (Py-P) + ADP (1)

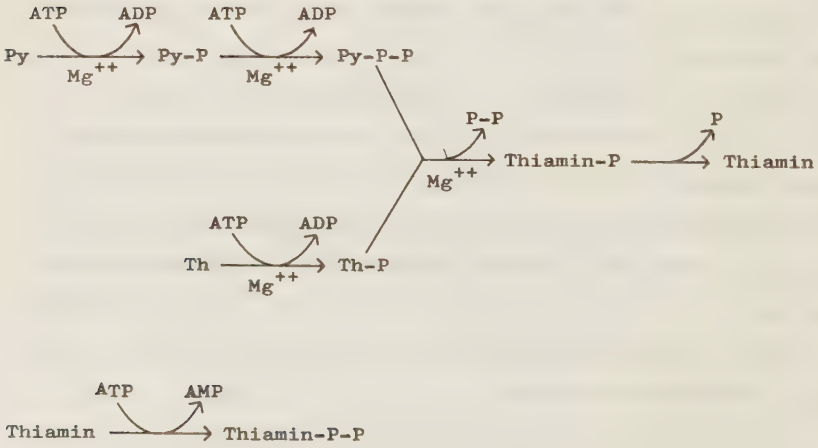
Py-P + ATP $\xrightarrow{Mg^{++}}$ Py-P-P + ADP (2)

4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol + ATP $\xrightarrow{Mg^{++}}$ 4-Methyl-5-(2-phosphoryläthyl)-thiazol (Th-P) + ADP (3)

Py-P-P + Th-P $\xrightarrow{Mg^{++}}$ Thiaminmonophosphat + Pyrophosphat (4)

Thiaminmonophosphat + H_2O ⟶ Thiamin + Phosphat (5)

Thiamin + ATP ⟶ Thiaminpyrophosphat + AMP (6)



Die Enzyme, die die Reaktionen (1) bis (6) katalysieren, heißen (1) Hydroxymethylpyrimidinkinase [31] (EC 2.7.1.49), (2) Hydroxymethylpyrimidinphosphokinase [31] (EC 2.7.4.7), (3) Thiazolkinase [32] (EC 2.7.1.50), (4) Thiaminphosphatsynthase [32] bzw. Thiaminphosphatsynthetase [27] oder Thiaminphosphatpyrophosphorylase [33,25] (EC 2.5.1.3), da die Reaktion reversibel ist, (5) Thiaminphosphatphosphatase [32] und (6) Thiaminpyrophosphokinase [32] (EC 2.7.6.2), ursprünglich als Thiaminokinase [34,27] bezeichnet.

Lewin und Brown [31] konnten durch folgende Versuche zeigen, daß sich die Pyrophosphorylierung des Pyrimidinteils in zwei getrennten enzymatischen Schritten mit der intermediären Bildung des Pyrimidinmonophosphates vollzieht: (a) Bei Inkubation des Hydroxymethylpyrimidins mit einem durch Ammoniumsulfat-Fällung und Chromatographie auf DEAE-Cellulose gereinigtem Enzymextrakt (Fraktion 1) aus Bäckerhefe erschien immer das Pyrimidinmonophosphat zuerst. (b) Durch Inkubation des Pyrimidinmonophosphates mit demselben Enzymextrakt wird ohne intermediäre Bildung des Hydroxymethylpyrimidins direkt das Pyrophosphat gebildet. (c) Die Nucleosidtriphosphate UTP, CTP und GTP können ATP bei der Bildung des Hydroxymethylpyrimidinmonophosphates ersetzen, nicht aber bei der Biosynthese des Pyrophosphates. (d) Ein gereinigter, für 10 min auf 55° C erhitzter Enzymextrakt besitzt nocht die Fähigkeit zur Synthese des Monophosphates, aber nicht des Pyrophosphates. (e) p-Hydroxymercuribenzoat hemmt die Bildung von Pyrophosphorylmethylpyrimidin vollständig, aber nicht die des Monophosphates.

Kawasaki et al. [25] konnten nach Inkubation von Hydroxymethyl-

pyrimidin mit einem zellfreien Hefeextrakt durch Gradientenelution mit Ammoniumformiat-Puffer auf einer Dowex 1-Formiat-Säule das Pyrophosphat nachweisen. Bei Inkubation von markiertem Hydroxymethylpyrimidinmonophosphat-^{32}P mit dem gleichen Enzymextrakt entstand radioaktives Hydroxymethylpyrimidinpyrophosphat [27].- Bei der enzymatischen Umsetzung von Hydroxymethylpyrimidin mit ATP-γ-^{32}P durch einen angereicherten Enzymextrakt aus Hefe entstand radioaktives Mono- und Pyrophosphat. Eine Bildung des Monophosphates aus dem Pyrophosphat durch Hydrolyse konnte ausgeschlossen werden, da die spezifische Aktivität des Monophosphates ca. 4 mal so hoch war wie die des β-P-Atoms des eingesetzten ATP. Die spezifische Aktivität des gebildeten Pyrophosphates war etwa 1,6 mal so groß wie die des Monophosphates, aber das Pyrophosphat enthielt nur ca. 60% der Radioaktivität des angebotenen ATP. Da jedoch auch aus Hydroxymethylpyrimidinmonophosphat-^{32}P synthetisiertes Pyrophosphat nur 66% der Radioaktivität des eingesetzten Substrates aufweist, schlossen Nose und Mitarbeiter [27] auf eine Zweischritt-Pyrophosphorylierung des Hydroxymethylpyrimidins durch ATP.

Die Enzyme, die die Reaktionen (1) bis (6) katalysieren, konnten alle angereichert und zum Teil voneinander getrennt werden. Camiener und Brown [32] konnten den Enzymkomplex aus Bäckerhefe durch Ammoniumsulfat-Fällung und Chromatographie auf DEAE-Cellulose in zwei Fraktionen trennen. Fraktion 1 enthält die Enzyme zur Bildung des Pyrimidinpyrophosphates aus Hydroxymethylpyrimidin (Reaktionen (1) und (2)) und zur Synthese von Thiaminpyrophosphat aus Thiamin (Reaktion (6)). Die Fraktion 2 enthält

die Enzyme Thiazolkinase und Thiaminphosphatsynthetase (Reaktionen (3) und (4)). Die Thiaminphosphatphosphatase konnte bei dieser Aufarbeitung abgetrennt werden, im Rohextrakt war sie noch nachweisbar. Alle beteiligten Kinasen und die Thiaminphosphatsynthetase benötigen Mg^{++} als Cofaktor [31,35,29,20,17,32]. Eine geringe Aktivität besitzt auch Mn^{++} [26,29].

Die Enzyme besitzen wenigstens teilweise essentielle SH-Gruppen, die mit Cystein oder Komplexbildnern, wie EDTA oder Glycylglycin-Puffer, gegen Inaktivierung geschützt werden können [32,31].- Das pH-Optimum des ganzen Enzymkomplexes liegt zwischen pH 6,8 und 9,0. Kawasaki bestimmte das pH-Optimum der Gesamtreaktion auf pH 7 in Trismaleat- und Tris-HCl-Puffer und auf pH 7,5 in McIlvaine-Puffer [22,26].- Die enzymatische Aktivität in Fraktion 1 wird durch 5-minütiges Erhitzen auf 55° C zerstört. Jedoch bleibt Aktivität der Fraktion 2 bei dieser Hitzebehandlung erhalten [32]. Auch Kawasaki et al. konnten durch 2-minütiges Erhitzen des Enzymextraktes auf 55° C die Pyrophosphorylierung von Hydroxymethylpyrimidin vollkommen verhindern, nicht aber die Thiazolkinase und Thiaminphosphatsynthetase inaktivieren [24,27].- Die Michaeliskonstante der Thiaminphosphatsynthetase wurde für Hydroxymethylpyrimidinpyrophosphat zu $4,6 \times 10^{-7}$ M bestimmt [28].

Durch Inkubation von Thiazol mit Enzymfraktion 2 entsteht ein Thiazolderivat, das durch Bioautographie mit einer thiazolbedürftigen E. coli-Mutante, enzymatischen Abbau mit alkalischer Phosphatase und Cochromatographie mit authentischem Thiazolmonophosphat als solches identifiziert wurde [32] (siehe auch 24).

Die B_6-Vitamine, sowie einige Verbindungen mit B_6-ähnlicher Struktur aber Anti-B_6-Aktivität, hemmen die Thiaminbiosynthese, und zwar kompetitiv mit dem Pyrimidinteil [36-38]. Eine genauere kinetische (Lineweaver-Burk-Diagramm) Analyse zeigte, daß eine Hemmung der Thiaminphosphatsynthetase-Reaktion durch Pyridoxalphosphat vom gemischten Typ vorliegt, d.h. eine Mischung aus einem rein nicht kompetitiven Typ und einem teilweise kompetitiven Typ (teilweise kompetitiv mit Hydroxymethylpyrimidinpyrophosphat) [35].- 2-Amino-4-methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol hemmt in einer Konzentration von 10^{-7} M das Wachstum von E. coli-Wildstamm, einer Thiazolmutante (Stamm 26-43) und einer Pyrimidinmutante (Stamm 70-17) vollkommen, jedoch nicht das Wachstum der Thiaminmutante 70-23, die das Hydroxymethylpyrimidin nicht pyrophosphorylieren kann [39] (siehe auch [16,40]). Iwashima [30,41] konnte durch kinetische Untersuchungen zeigen, daß 2-Amino-4-methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol kompetitiv (K_i = 1,5 x 10^{-8} M) die Thiazolkinase und das entstandene 2-Amino-4-methyl-5-(2-phosphoryläthyl)-thiazol die Thiaminphosphatsynthetase hemmt. Eine Mutante, die gegen 2-Amino-4-methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol resistent ist, zeigte eine verminderte Permeabilität der Zellmembran für diesen Inhibitor [42].

Shimazono et al. [34] konnten die Thiaminpyrophosphokinase aus Bäckerhefe ca. 100-fach anreichern. Das gereinigte Enzym synthetisierte aus Thiamin und ATP-γ-^{32}P Thiamindiphosphat, in dem sich die Radioaktivität der P-Atome α und β wie 1 zu 11 verhielt. (Das β-Phosphat ist leicht mit 1 N HCl hydrolytisch abspaltbar.) Dieses Experiment beweist die Übertragung der Pyrophosphoryl-Gruppe von

ATP auf das Thiamin nach folgender Gleichung:

$$\text{Thiamin} + \text{AR-P}\{\text{P-}^{32}\text{P} \longrightarrow \text{Thiamin-P-}^{32}\text{P} + \text{ARP}$$

Ultraschallextrakte eines E. coli-Wildstammes vermögen ebenfalls Thiamin aus Hydroxymethylpyrimidin und Thiazol zu synthetisieren [43]. Auch Extrakte aus einer Pyrimidinmutante (Stamm 70-17) und einer Thiazolmutante (Stamm 26-43) besitzen noch diese Fähigkeit. Jedoch kann die Mutante 70-23, die nur mit Thiamin wächst, das Hydroxymethylpyrimidin nicht mehr in die aktive Form (Pyrophosphat) bringen, da sie keine aktive Hydroxymethylpyrimidinkinase und/oder Hydroxymethylpyrimidinphosphokinase besitzt [40].

Durch Wachstumsversuche und Untersuchungen mit Enzymextrakten konnte gezeigt werden, daß alle untersuchten Organismen - in unterschiedlichem Ausmaß - die Fähigkeit besitzen, in 5-Stellung veränderte Analoga des 2-Methyl-4-amino5-hydroxymethylpyrimidins in dieses enzymatisch umzuwandeln. Auf die Wachstumsversuche soll später eingegangen werden; hier sollen nur die Ergebnisse der enzymatischen Experimente referiert werden. Das 5-Formylaminomethylpyrimidin und das 5-Aminomethylpyrimidin besitzen im Enzymversuch mit Hefeextrakt ca. 66% der Thiamin synthetisierenden Aktivität des 5-Hydroxymethylpyrimidins und die 5-Carboxyl-, 5-Formyl- und 5-Methylsulfonsäurederivate weniger als ein Drittel der Aktivität [22,26]. Zellen von Neurospora crassa, deren Pyrimidinbiosynthese durch Thiamin reprimiert ist, können die 5-Hydroxymethyl-, 5-Amino- und 5-Methoxymethylverbindungen wechselseitig ineinander überführen [44].

Nach Harris [45] sollen zwei Thiaminmutanten von Neurospora crassa (thi-1), die den Pyrimidin- und Thiazolteil zum Wachstum benötigen, eine thiaminähnliche Verbindung akkumulieren, bei der der fertige Pyrimidinteil an einen Vorläufer des Thiazolteils gebunden ist. Es wird angenommen, daß die Biosynthese des Thiamins über diese Verbindung eine Alternativmöglichkeit darstellt. Untersuchungen von Eberhart und Tatum [46] legen jedoch den Schluß nahe, daß es sich bei der oben genannten hypothetischen Verbindung um Thiaminpyrophosphat handelte. Aus Kreuzungsexperimenten geht hervor, daß das Gen thi-1 etwas mit der Verwertung (Pyrophosphorylierung) des Thiamins zu tun hat [47].

3. Biosynthese des Pyrimidinteils.

Obwohl schon seit Beginn der Untersuchungen vermutet wurde, daß die Biosynthese des Pyrimidinteils des Thiamins von der Biosynthese der Pyrimidine, die Bestandteil der Nucleinsäuren sind, verschieden ist, soll nach Nakayama [48] ein Gemisch aus Thymin und Uracil, statt Hydroxymethylpyrimidin, das Wachstum einer Hydroxymethylpyrimidin-bedürftigen Mutante (Stamm 70-17) von E. coli unterstützen.

Thiamin, Hydroxymethylpyrimidin und verschiedene in 5-Stellung modifizierte Analoga heben die Wachstumshemmung von Bacillus subtilis durch Amethopterin auf [49]. Nähere Untersuchungen zeigten, daß ^{14}C-Formiat mit geringer Verdünnung in den Pyrimidinteil, aber nicht in den Thiazolteil eingebaut wird [50,51]. Der Einbau in den Pyrimidinteil ist ähnlich demjenigen in Purine, aber beträchtlich größer als der in Thymin. Hydroxymethylpyrimidin vermindert die Inkorporation radioaktiven Formiats in Thiamin, und

Amethopterin hemmt seinen Einbau in Hydroxymethylpyrimidin vollständig.

In mehreren Arbeiten [52-56] haben David, Estramareix und Hirshfeld gezeigt, daß bei Saccharomyces cerevisiae ^{14}C-Formiat in die 4-Stellung des Pyrimidinteils eingebaut wird. Zunächst bauten sie das isolierte Thiamin zu 2-Methyl-4-amino-5-carboxylpyrimidin ab und decarboxylierten dieses zu 2-Methyl-4-aminopyrimidin. Das freigesetzte CO_2 enthielt keine Aktivität, und die spezifische Aktivität des Pyrimidins blieb bei der Decarboxylierung unverändert.

In weiteren Experimenten bauten sie mit ^{14}C-Formiat markiertes Thiamin über (2-Methyl-4-hydroxy-5-pyrimidinyl-methylthio)-essigsäure (IV) zu aktivem 1,3-Diamino-2-methylpropan (V) ab, das die C-Atome 4 bis 7 des Pyrimidinteils besitzt [54]. Die Kuhn-Roth-Oxidation des Diamins ergab inaktive Essigsäure und aktives CO_2, was die Radioaktivität auf die C-Atome 4 oder 5 lokalisiert [55]. Durch Kuhn-Roth-Oxidation von 2-Methyl-4-hydroxypyrimidin-5-methylsulfonsäure entsteht inaktive Essigsäure (C-Atome 5 und 7)[56].

Nach Abbau von IV über aktives 2,5-Dimethyl-4-hydroxypyrimidin zu 1,2,3,5-Tetramethylpyrimid-4-on-jodid wurde dieses mit 5 M NaOH zu Ameisensäure (C-Atom 6), Essigsäure (C-Atome 2 und 8), Propionsäure (C-Atome 4,5 und 7) und 2 Mol Methylamin hydrolysiert. Die Propionsäure - das einzige radioaktive Abbauprodukt - wurde dem Schmidt-Abbau unterworfen. Man erhielt aktives CO_2 (C-Atom 4) und inaktive Essigsäure (C-Atome 5 und 7). Um diesen

Abbau zu sichern, synthetisierten sie in 4-Stellung ^{14}C-markiertes 2,5-Dimethyl-4-hydroxypyrimidin und unterwarfen es gleichen Reaktionen. Sie kamen zu denselben Ergebnissen wie beim Abbau der aus Thiamin gewonnenen Verbindung.

Tomlinson [57] wendete nach Einbau von ^{3}H- und ^{14}C-markiertem Acetat bei Bacillus subtilis die gleichen Abbaumethoden an wie David, Estramareix und Hirshfeld. Bei Einbau von 2-^{14}C-Acetat weist das Diamin V (C-Atome 4 bis 7) nur 6 % der Radioaktivität des Pyrimidins IV (C-Atome 1 bis 8) auf. Die Radioaktivität kann daher nur in C-Atom 2 oder der ihm benachbarten Methylgruppe lokalisiert gewesen sein. Mit 1-^{14}C-Acetat kann der Pyrimidinteil nicht markiert werden, wohl aber mit 1,2-^{14}C-Acetat. - Markierungsversuche [55] mit 2-^{14}C, Me-^{3}H-Acetat, 1-^{14}C, Me-^{3}H-Acetat, Me-^{3}H-Acetat und 1,2-^{14}C, Me-^{3}H-Acetat zeigten nach Abbau zu (2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinyl-methan)-sulfonsäure (VI), daß die Wasserstoffatome und das C-Atom der Methylgruppe eingebaut werden, aber nicht das C-Atom der Carboxylgruppe. Die Methylgruppe an C-2 ist daher die einzige Position, in die beide Isotope inkorporiert werden. In den Thiazolteil wird das C-Atom 2 in weitaus geringerem Ausmaß eingebaut als in den Pyrimidinteil. - ^{14}C-Carbonat, ^{14}C-Alanin, Me-^{14}C-Methionin, ^{3}H-Alanin und ^{3}H-Methionin konnten nicht in den Pyrimidinteil eingebaut werden. Mit ^{14}C-Aspartat wurde sowohl das Pyrimidin IV wie das Diamin V markiert.- Auch Nakamura [59] gelang es, bei einer thiazolbedürftigen E. coli-Mutante DL-2-^{14}C-Aspartat in den Pyrimidinteil des Thiamins einzubauen.

Johnson, Howells und Goodwin [60,61] fanden nach Einbau von ^{14}C-Formiat in Thiamin bei Saccharomyces cerevisiae über 99 % der

Aktivität (bezogen auf Thiamin) im Pyrimidinteil (VI) wieder. Bei dessen oxidativem Abbau mit $KMnO_4$ entstand neben Propionsäure Essigsäure, in der fast die gesamte Radioaktivität lokalisiert war. Daraus schließen die Autoren, daß die Methylgruppe am C-Atom 2 vom Formiat stammt. Es muß jedoch eingeräumt werden, daß nach den beschriebenen Experimenten der Autoren auch das C-Atom 2 selbst durch Formiat markiert worden sein kann (siehe auch [62]).-
6-^{14}C-Orotsäure und L-U-^{14}C-Alanin werden nach Johnson et al. nicht in den Pyrimidinteil eingebaut. 1-^{14}C-Acetat wird ebenfalls nicht inkorporiert und 2-^{14}C-Acetat etwa 5-mal weniger in VI als in den Thiazolteil.

Aus Markierungsversuchen von Goldstein und Brown [63] an E. coli geht hervor, daß von allen ausgetesteten Substanzen ^{14}C-Formiat am stärksten (1 bis 5-fache Verdünnung der spezifischen Aktivität) inkorporiert wird. Die spezifische Aktivität von 2-^{14}C-Glycin wird 25-fach und die von 2-^{14}C-Acetat 10-fach verdünnt. U-^{14}C-Uracil, DL-Me-^{14}C-Methionin, 2-^{14}C- und 6-^{14}C-Orotsäure, U-^{14}C- und 4-^{14}C-Aspartat und DL-3-^{14}C-Serin werden nicht in den Pyrimidinteil des Thiamins eingebaut.

Diese Versuche zeigen ebenso deutlich wie die Ergebnisse von Johnson, Howells und Goodwin, daß der Pyrimidinteil des Thiamins auf einem anderen Wege biosynthetisiert wird als die in den Nucleinsäuren vorkommenden Pyrimidinbasen.

Kumaoka und Brown [62] fanden in Markierungsversuchen an E. coli, daß Formiat und beide C-Atome des Acetats in den Pyrimidinteil

eingebaut werden. Die gefundenen Verdünnungen der spezifischen Aktivität waren für 1-^{14}C-Acetat 21-fach, für 2-^{14}C-Acetat 53-fach und für ^{14}C-Formiat ca. 2-fach. Da jedoch Formiat die Inkorporation von in 2-Stellung markiertem Acetat auf einen verschwindend kleinen Wert erniedrigt (241-fache Verdünnung der spezifischen Aktivität), wird von den Autoren angenommen, daß Acetat kein direkter Baustein des Pyrimidinteils ist.

Um die Einbaustelle des Formiats zu fixieren, spalteten Kumaoka und Brown das markierte Thiamin durch Sulfitolyse und unterwarfen die entstandene Pyrimidinsulfonsäure (VI) der Kuhn-Roth-Oxidation. Die gebildete Essigsäure (C-Atom 2 und Methylgruppe) enthielt 68% und das gebildete CO_2 (C-Atome 4 bis 7) nur 20% der Radioaktivität. Nach weiterem Abbau der aktiven Essigsäure durch Pyrolyse zu Aceton und CO_2 war die gesamte Radioaktivität im CO_2 (Carboxyl-C-Atom der Essigsäure und C-Atom 2 des Pyrimidinteils) fixiert. Die nachfolgenden Abbauprodukte des Acetons - Jodoform nach Oxidation mit Hypojodit und CO_2 nach Oxidation des Jodoforms - waren inaktiv.

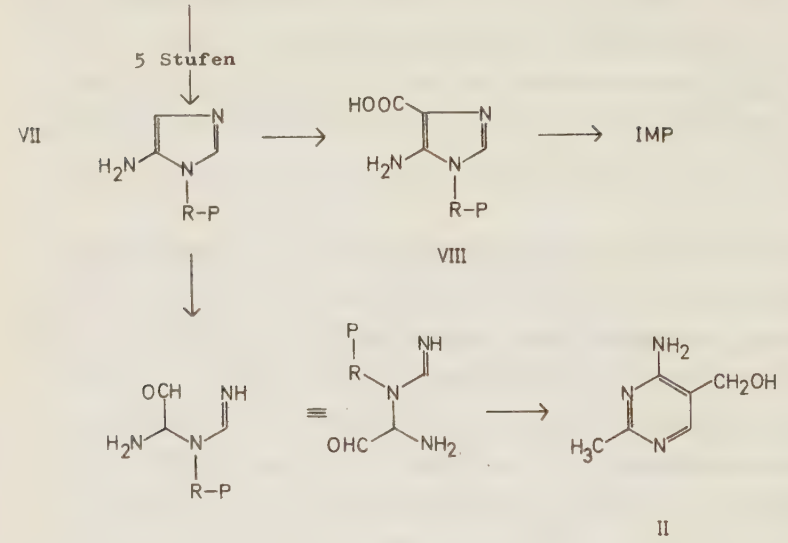
Um zu prüfen, ob die geringe Markierung des CO_2 nach dem oxidativen Abbau von VI durch Oxidation der radioaktiven Essigsäure entstanden ist oder ein geringer Einbau des Formiats in die C-Atome 4 bis 7 erfolgt, wurde das Thiamin über IV und 2,5-Dimethyl-4-hydroxypyrimidin abgebaut, dessen Hydrolyse mit 12 N HCl β-Aminoisobuttersäure (C-Atome 4 bis 7) ergab. Die Pyrimidine des Abbauweges waren noch radioaktiv, die β-Aminoisobuttersäure jedoch nicht mehr. Aus den beschriebenen Experimenten schließen Kumaoka und Brown, daß Formiat nur in Stellung 2 des Pyrimidinteils eingebaut wird.

Aus den geschilderten Experimenten wird deutlich, daß die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen stark differieren. Alle Untersucher stimmen jedoch darin überein, daß Formiat von allen untersuchten Metaboliten am stärksten in den Pyrimidinteil eingebaut wird. Nur die Frage, in welche Position des Pyrimidinteils es eingebaut wird, beantworten alle Autoren unterschiedlich:

David, Estramareix und Hirshfeld schließen auf eine Inkorporation in 4-Stellung, Kumaoka und Brown in 2-Stellung und Johnson, Howells und Goodwin in die Methylgruppe an C-2, obwohl aus ihren Experimenten selbst nur hervorgeht, daß Formiat in die Methylgruppe und/oder das C-Atom 2 eingebaut wird. - Ferner wird nach den Untersuchungen aller Arbeitsgruppen in geringem Umfang Acetat eingebaut. Jedoch, ob es ein direkter Vorläufer ist und ob nur das Methyl-C-Atom inkorporiert wird, bleibt unsicher. - Vielleicht wird auch noch Aspartat zur Biosynthese des Pyrimidinteils benötigt.

Newell und Tucker fanden durch ihre Untersuchungen an Salmonella typhimurium [64-66], daß die Biosynthese des Pyrimidinteils von der Purinbiosynthese abzweigt und das letzte gemeinsame Zwischenprodukt 4-Aminoimidazolribonucleotid (VII) ist (s.Abb.). Schon frühere Arbeiten anderer Autoren deuteten darauf hin [67-70].

5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat,
Glycin, Glutamin, Formiat und ATP



Folgende Untersuchungen beweisen ihre Vorstellungen:

(1) 2-^{14}C-Glycin wird von einer Dreifachmutante (Thiamin, trp, gly (oder ser)) von Salmonella typhimurium mit einer 1,1-fachen Verdünnung der spezifischen Radioaktivität in den Pyrimidinteil, der von dieser Mutante akkumuliert wird, eingebaut. Die spezifische Aktivität von 1-^{14}C-Glycin wird 1,3-fach verdünnt. Dies zeigt, daß wie bei der Purinbiosynthese beide C-Atome des Glycins direkt in den Pyrimidinteil des Thiamins inkorporiert werden.

(2) Alle Mutanten, die vor 4-Aminoimidazolribonucleotid blockiert sind (ath-Mutanten), benötigen Adenin und den Pyrimidinteil des Thiamins zum Wachstum und alle Mutanten, die danach blockiert

sind (Ad-Mutanten), nur ein Purin. 14 von 60 erzeugten Purinmutanten akkumulierten VII. Dieses entsteht jedoch auch spontan durch Decarboxylierung von 4-Aminoimidazol-5-carbonsäureribonucleotid (VIII) (Gots, J.S., zitiert in [67]). Da aber alle 14 VII-akkumulierenden Mutanten nur ein Purin zum Wachstum benötigen, ist VII wahrscheinlich das Verzweigungsprodukt.

(3) Newell und Tucker isolierten eine Spontanmutante (β), die statt mit einem Purin und dem Pyrimidinteil des Thiamins mit 4-Aminoimidazolribonucleosid (IX), das aus dem Akkumulationsmedium einer IX ausscheidenden Ad-Mutante isoliert wurde, wächst. VII muß daher ein gemeinsames Zwischenprodukt sein.

(4) Eine Mehrfachmutante (Thiazol, trp, ath) synthetisiert in Gegenwart von IX große Mengen des Pyrimidinteils, jedoch nicht unter Repressionsbedingungen mit Thiamin.

(5) ^{14}C-markiertes IX wurde aus dem Akkumulationsmedium einer IX-ausscheidenden Glycinmangelmutante (Thiamin, trp, gly, Ad), die mit 1-^{14}C-Glycin gefüttert wurde, isoliert und durch Thiamin reprimierten Zellen, sowie dereprimierten Zellen (ohne Thiamin) derselben Mutante wie in Versuch (4) angeboten. Nur von der dereprimierten Kultur wurde markiertes Pyrimidin akkumuliert. Die Verdünnung der spezifischen Radioaktivität war 1,2-fach.

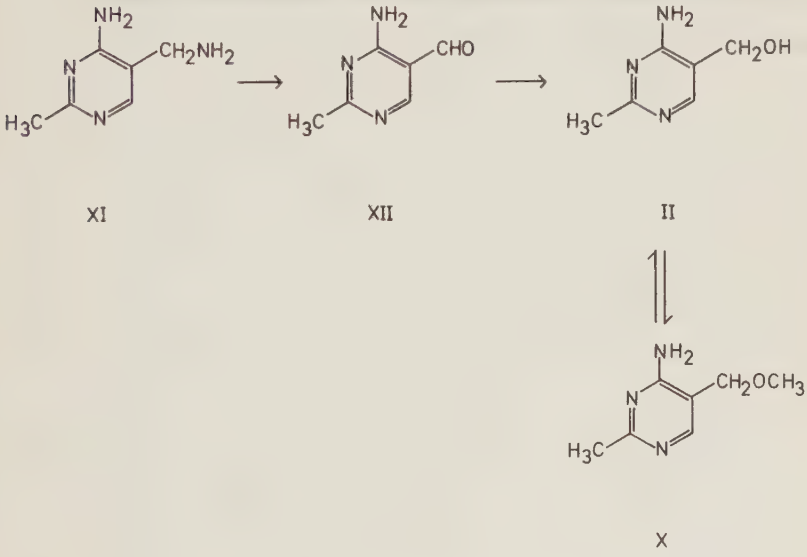
Von 16 verschiedenen Dreifachmutanten (Thiamin, trp, x) konnten nur eine Glycin- und eine Methioninmangelmutante in Gegenwart von Glycin bzw. Methionin den Pyrimidinteil akkumulieren. Die

Pyrimidinakkumulation der Methioninmutante wird durch Äthionin auf ca. 50 % erniedrigt; sie ist ferner der Methioninkonzentration linear proportional. Radioaktives Me-^{14}C oder U-^{14}C-Methionin wird jedoch nicht in den Pyrimidinteil inkorporiert.- Die Glycinmangelmutante (Thiazol, trp, ath, β, gly) kann auch in Abwesenheit von Glycin aus IX den Pyrimidinteil synthetisieren und akkumulieren, nicht jedoch die Methioninmutante (Thiazol, trp, ath, β, met) in Abwesenheit von Methionin. Daraus schließen die Autoren, daß Glycin zur Synthese des VII und Methionin auf dem Biosyntheseweg zwischen VII und Hydroxymethyl-pyrimidin benötigt wird. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß die Akkumulation des Pyrimidinteils bei Neurospora crassa-Mutanten durch Methionin gesteigert wird [44].

Die Hypothese von Newell und Tucker [66], daß das 4-Aminoimidazolribonucleotid durch Spaltung der N_1-C_5-Bindung, Abspaltung des Ribosephosphatteils und Addition einer C_3-Einheit in den Pyrimidinteil umgewandelt wird, beruht auf den unbestätigten Resultaten von David, Estramareix und Hirshfeld, daß Formiat in das C-Atom 4 des Pyrimidinteils eingebaut wird. Erfolgt die Inkorporation von Formiat jedoch in das C-Atom 2 oder die Methylgruppe, wie aus den Experimenten von Kumaoka und Brown bzw. Johnson, Howells und Goodwin hervorgeht, kann diese Hypothese nicht aufrecht gehalten werden.

Eine Thiazol-bedürftige (Stamm 132) und eine Thiamin-bedürftige (Stamm 611) Mutante von Neurospora crassa akkumulieren unter limitierenden Mengen Thiamin vier Pyrimidinverbindungen, die nach Isolierung durch Ionenaustausch-, Papier- und Verteilungschromato-

graphie und Fällungsmethoden als 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidin (II) und seine 5-Methoxymethyl- (X), 5-Aminomethyl- (XI) und 5-Formylanalogen (XII) erkannt wurden [44,71,72]. IR- und UV-Spektroskopie, vergleichende Elektrophorese und Papierchromatographie, sowie qualitative mikroanalytische Verfahren dienten zur Identifizierung. Die Autoren postulieren folgenden Biosyntheseweg für den Pyrimidinteil [67]:



2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin wird auch von anderen Mutanten (Thiazol-bedürftige Mutante thi-1o und Thiamin-bedürftige Mutante thi-28 von Salmonella typhimurium [73,74,64-66], sowie Thiazol- und Thiamin-Mangelmutanten von Neurospora crassa [44]) in größeren Mengen ans Medium abgegeben.

Zahlreiche in 2-, 4-, 5- und 6-Stellung vom 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin abweichend substituierte Pyrimidine wurden auf Wachstumsaktivität bei mehreren Organismen und Mutanten getestet. Substitution der 4-Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe macht das Molekül für alle Organismen vollkommen inaktiv [75,76]. Ebenso essentiell ist die 2-Methylgruppe [76].

Über die Wachstumswirksamkeit von in 5-Stellung abweichend substituierten 2-Methyl-4-amino-pyrimidinen informiert folgende Tabelle:

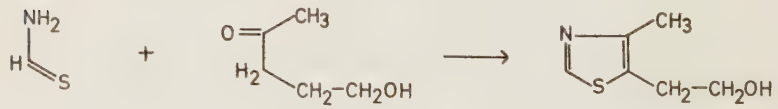
Organismus Mutante (Herkunft)	CH_2OH	CH_2OCH_3	$CH_2OC_2H_5$	CH_2NH_2	CH_2Cl	CH_2Br	CHO	CN	COOH	CH_2NHCHS	Referenz
A. aerogenes PD 1 (B. Magasanik)	+	+	n.b.	+	n.b.	+	+	n.b.	n.b.	n.b.	31,35,44,71,72
E. coli 70-17	+	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	+	-	-	n.b.	77
S. typhimurium ATh 4 (H. Ozeki)	+	-	n.b.	-	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	17
isolierte Erbsenwurzeln	+	n.b.	+	+	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	76
Phycomyces Blakesleeanus	100%	n.b.	100%	100%	n.b.	100%	n.b.	0,03%	n.b.	0,7%	75

n.b. = nicht bestimmt
\+ = Aktivität
\- = keine Aktivität

4. Biosynthese des Thiazolteils.

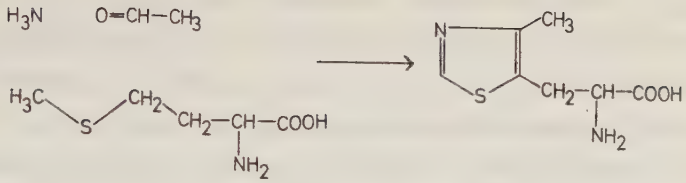
Da die Literatur bis 1961 bzw. 1963 ausführlich von Plaut [78] und Goodwin [1] referiert wird, wird besonders stark auf die neueren Arbeiten eingegangen.

Bonner und Buchman [10] berichteten, daß Erbsenwurzeln den Thiazolteil aus Thioformamid und Acetopropanol oder Chloracetopropanol synthetisieren können. Jedoch konnte diese klassisch-chemisch anmutende Vorstellung von der Biosynthese des Thiazols weder für Erbsenwurzeln [79] noch für die Mikroorganismen Phycomyces und Neurospora crassa [80] bestätigt werden. Ferner wird weder ^{35}S-γ-Mercapto-δ-aceto-propylacetat, noch ^{35}S-2-Methyl-4-amino-5-thioformylaminomethyl-pyrimidin von Pyrimidin-bedürftigen Hefen und Pilzen in Thiamin eingebaut [81].



III

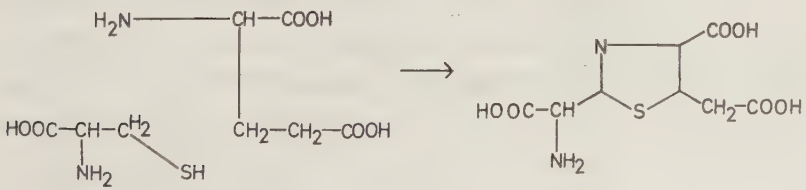
Harington und Moggridge [82,83] postulierten, daß der Thiazolteil aus α-Amino-β-(4-methylthiazol-5-yl)-propionsäure (Thiazolalanin) (XIII) entsteht, das wiederum aus Methionin, Acetaldehyd und Ammoniak gebildet werden könnte.



XIII

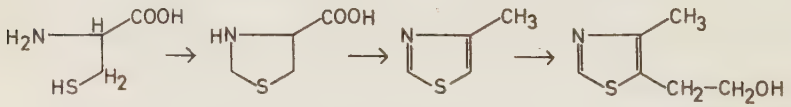
Einige experimentelle Daten sprechen für diese Möglichkeit: Die L-Form von XIII wird von Hefen [83], isolierten Erbsenwurzeln [10] und Tomatenwurzeln [84] in den Thiazolteil umgewandelt, aber nicht von Phycomyces Blakesleeanus (Bonner, zitiert von [85]) oder Staphylococcus aureus (Knight, zitiert von [82]).Die Inkorporation von ^{35}S-Sulfat in Thiamin wird bei Hefen durch den intakten Thiazolteil sehr stark verdünnt, jedoch durch XIII nur in geringem Maße [86]. Ferner unterstützt das Thiazolalanin das Wachstum einer Thiazolmangelmutante von E. coli nur ein tausendstel so stark wie der Thiazolteil selbst und wird von einem rohen E. coli-Enzymextrakt nur zu 0,01 % in den Thiazolteil umgewandelt [87].

Plaut [78] schlug in Analogie zur Biosynthese des Penicillins aus Cystein und Valin eine dritte Reaktion zur Biosynthese des Thiazolteils vor, nach der Cystein mit einer 5-Kohlenstoff-Aminosäure, beispielsweise Glutaminsäure, zu einem Thiazolidinderivat kondensiert, das in den Thiazolteil umgewandelt wird.



Nakayama [48] berichtete, daß die beiden Thiazolmutanten E. coli (26-43) und Neurospora crassa (18558 A) in beschränktem Maße mit 4-Methylthiazol wachsen können, aber nicht mit 4,5-Dimethylthiazol. Ferner wachsen beide Stämme mit Cystin oder 4-Thiazolidincarbonsäure, aber nicht mit Homocystin, Methionin oder Methanol. Beträchtliche Mengen Thiamin und Thiazolteil konnten bei Neurospora crassa nach Inkubation mit Cystin oder 4-Thiazolidincarbonsäure durch Bioautographie gefunden werden. Daher schlägt Nakayama folgendes Biosyntheseschema vor:

Cystin --> 4-Thiazolidincarbonsäure --> 4-Methylthiazol --> 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol.



Gegen dieses Biosyntheseschema spricht, daß, wie oben berichtet, die Wachstumswirksamkeit von 4-Methylthiazol nicht sehr groß ist. Ferner wird 2-^{14}C-4-Methylthiazol bei verschiedenen Hefen und Pilzen nicht in Thiamin eingebaut [15]. In Isotopenverdünnungsexperimenten wird die Inkorporation von ^{35}S-Sulfat in Thiamin bei Hefen durch 4-Methylthiazol nicht verdünnt, während dessen Vorläufer in dem vorgeschlagenen Biosyntheseschema (4-Thiazolidincarbonsäure) eine gute Aktivität besitzt [86].

Im folgenden sollen Isotopenversuche besprochen werden.
Linnett und Walker [88] untersuchten bei Saccharomyces cerevisiae die Inkorporation verschiedener markierter Verbindungen in die 2-Stellung des Thiazols durch Spaltung des Thiamins mit $NaHSO_3$ und Reduktion des 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol-methiodids mit Natriumborhydrid zum Thiazolidin, dessen Spaltung mit $HgCl_2$ Formaldehyd freisetzt, das mit Dimedon aufgefangen wird. Der Einbau von 2-^{14}C-Glycin in die Position 2 des Thiazolteils erreicht etwa 10%. Me-^{14}C-Methionin wird nur zu ca. 0,2% in C-2 eingebaut und ^{14}C-Formiat gar nicht, jedoch in den ganzen Thiazolteil zu ca. 2%. Über Experimente zur Inkorporation von 1-^{14}C-Glycin wurde nichts berichtet. Die Autoren folgern, daß Formiat eines der C-Atome des Thiazolteils mit Ausnahme von C-2 liefert und daß Glycin als Ganzes eingebaut wird, um anschließend seine Carboxylgruppe abzuspalten.

Johnson, Howells und Goodwin [60,61] untersuchten bei Hefen die Inkorporation von Methionin und Cystin in den Thiazolteil. Me-^{14}C-Methionin wird wesentlich stärker in den Thiazolteil eingebaut als in den Pyrimidinteil. Die spezifische Aktivität des Thiamins ist nach Gabe von DL-^{35}S-Methionin mehr als eine Zehnerpotenz größer als nach Gabe von DL-^{35}S-Cystin unter sonst gleichen Bedingungen. Während der Inkorporation von L-Me-^{14}C, ^{35}S-Methionin in den Thiazolteil ändert sich das ^{14}C/^{35}S-Verhältnis von 1 : 1 nicht. Die Autoren schließen daraus, daß die CH_3S-Gruppe, wahrscheinlich sogar das intakte Methionin als Ganzes, für die Thiazolbiosynthese benötigt wird. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit der Theorie von Harington und Moggridge [82,83].

Da 1-^{14}C-Acetat ebenso stark wie 2-^{14}C-Acetat eingebaut wird, vermuten die Autoren, daß Acetat als Ganzes ein Vorläufer von C-Atom 4 und der benachbarten Methylgruppe ist. L-U-^{14}C-Alanin wird jedoch noch stärker inkorporiert. Daher diskutieren die Autoren die Möglichkeit, daß Alanin mit Methionin ein zyklisches Zwischenprodukt bildet und so N-3, C-4 und die Methylgruppe des Thiazolteils liefert.

Tomlinson, Kuhlman, Torrence und Tieckelman [57,58] untersuchten bei Bacillus subtilis mit sehr kurzen Inkubationszeiten (10-20 min) die Inkorporation zahlreicher markierter Verbindungen in den Thiazolteil. ^{14}C-Carbonat, ^{14}C-Formiat, 1-^{14}C-Acetat, 1,2-^{14}C-Acetat und Me-^{3}H-Acetat werden nicht eingebaut. Aus der Inkorporation von ^{3}H mit ^{3}H-Methionin folgern die Autoren, daß Methionin auch ein Vorläufer der Methyl- oder Hydroxyäthylgruppe ist, da nur diese beiden Gruppen stabile Wasserstoffatome besitzen. Bei der Inkorporation von Me-^{14}C, ^{3}H-Methionin wird 31 % des Tritiums, relativ zu ^{14}C eingebaut.

Durch Markierung mit ^{14}C-, ^{3}H- und ^{14}C, ^{3}H-Alanin wurde sichergestellt, daß Alanin ein Baustein bei der Biosynthese des Thiazols ist. Wie Johnson, Howells und Goodwin vermuten auch Tomlinson und Mitarbeiter, daß es in N-4, C-5 und die Methylgruppe eingebaut wird. Jedoch ist die Beibehaltung des ^{14}C/^{3}H-Verhältnisses bei der Inkorporation von ^{14}C, ^{3}H-Alanin nicht mit dessen Rolle als Thiazolbaustein vereinbar.

In Experimenten mit E. coli bei einer Inkubationszeit von 24 h konnten Agaki und Kumaoka [89] den Thiazolteil mit ^{35}S-Sulfat mar-

kieren.- Sowohl die spezifische Aktivität (auf Atom Schwefel bezogen) von ^{35}S-Cystin wie die von ^{35}S-Methionin wurde 20-fach verdünnt [90].

Hitchcock und Walker [86] untersuchten, wie stark die spezifische Radioaktivität von ^{35}S-Sulfat bei der Inkorporation in Thiamin durch verschiedene schwefelhaltige Verbindungen verdünnt wird: sehr starke Verdünnung durch 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol; starke Verdünnung durch S-Adenosylmethionin, Natriumsulfat, Glutathion, Methionin, 4-Thiazolidincarbonsäure und 5'-Desoxy-5-methylthioadenosin; schwache Verdünnung durch α-Amino-β-(methylthiazol-5-yl)-propionsäure, Natriumsulfid und Thioessigsäure; keine Verdünnung durch Cystein, Homocystein, 2-Methyl-4-amino-5-thioformamidomethyl-pyrimidin, 4-Methylthiazol, usw.

Sowohl Goodwin wie Tomlinson vermuten, daß der Thiazolteil aus Methionin und Alanin synthetisiert wird. Während Goodwin nur auf den Einbau der CH_3S-Gruppe schließen kann, folgert Tomlinson aus seinen Experimenten auch eine Inkorporation weiterer C-Atome des Methionins. Vernünftigerweise sollte man dann annehmen, daß die Methylgruppe des Methionins zum C-Atom 2 des Thiazolringes wird. Linnett und Walker finden jedoch einen starken Einbau des C-2 von Glycin und nur einen sehr geringen von Me-^{14}C-Methionin in diese Position.

Hitchcock und Walker [86] konnten in ihren Verdünnungsversuchen einen stärkeren Einbau von Methionin als von Cystein nachweisen. Jedoch wird Methionin in den Experimenten von Kumaoka [90] ebenso wirksam inkorporiert wie Cystein.

Mit Ausnahme von Linnett und Walker stimmen alle Autoren darin überein, daß Formiat kein Baustein des Thiazolteils ist [52,60,61].

Verschiedene, in 5-Stellung veränderte Analoga des 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazols sind für isolierte Erbsenwurzeln und Phycomyces Blakesleeanus noch wachstumswirksam. Dabei muß unterschieden werden zwischen Substituenten, die in die CH_2CH_2OH-Gruppe umgewandelt werden, wie $-CH_2CH_2Cl$, $-CH=CH_2$, $-CH_2CH_2SH$, $-CH_2CH_2NH_2$ und $-CH_2CHNH_2COOH$, und Substituenten, für die die Zelle nicht diese Fähigkeit besitzt, die aber trotzdem wachstumsaktiv sind, wie $-CH_2CHOHCH_3$ und $-CH_2CH_2CH_2OH$. Dagegen bewirken folgende Substituenten eine völlige Inaktivierung des Thiazols: -H, $-CHOHCH_3$ und $-COOH$ [10,75,76]. Jedoch werden alle Reste, die im Thiazol noch Wachstumsaktivität ergeben, unwirksam, wenn sie die entsprechende Stelle des Thiamins substituieren [75,76]. Ferner erreichen in Wachstumstesten mit einer Thiazolmangelmutante (18558) von Neurospora crassa [80] alle genannten - aktiven und inaktiven - Analoga nicht mehr als 1 % der Wachstumswirksamkeit des 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazols.

Eine Methylgruppe in C-2 des Thiazols macht das Molekül für alle Organismen, sowie eine Äthoxygruppe in 2-Stellung für Phycomyces Blakesleeanus, vollkommen inaktiv [75,76]. Über die kompetitive Hemmwirkung des 2-Amino-4-methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazols wurde schon in dem Abschnitt "Kondensation des Pyrimidinteils mit dem Thiazolteil" berichtet.

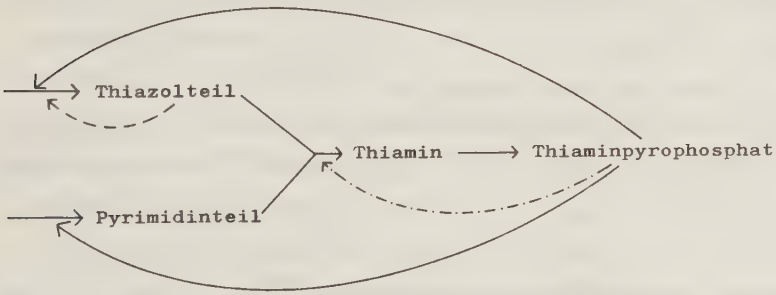
Lewin und Diorio [91] (siehe auch [92]) konnten zeigen, daß zwei Thiamin-bedürftige Mutanten von Neurospora crassa, thi 2 und thi 4,

unter limitierenden Thiaminmengen 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol und eine unbekannte Verbindung akkumulieren, die für zwei Thiazolmutanten fütterungswirksam, aber nicht mit dem Thiazolteil oder seinem Phosphatester identisch ist. Durch Zugabe von 2,5 mg Thiamin/l wird die Akkumulation beider Verbindungen gehemmt.

Die Pyrimidin-bedürftige Mutante thi-1 und die Thiamin-bedürftige Mutante thi-28 von Salmonella typhimurium akkumulieren unter limitierenden Mengen von Thiamin keine Verbindung, die die Thiazolmutante thi-10 von Salmonella typhimurium füttert [74]. Moyed [93] konnte ebenfalls keine Akkumulation des Thiazolteils entdecken, wenn die Biosynthese des Pyrimidinteils bei Aerobacter aerogenes durch Adenosin gehemmt war.

5. Regulation.

Newell und Tucker [73,74] haben in einer ausführlichen Arbeit die Regulation der Thiaminbiosynthese bei Salmonella typhimurium untersucht. Folgende Abbildung faßt ihre Ergebnisse zusammen:



——— = Repression (40 mμg Thiamin/mg Trockengewicht)
-.-.-.-. = Repression (100 mμg Thiamin/mg Trockengewicht)
- - - - = Hemmung (1 mμg Thiazol/mg Trockengewicht)

Thiaminpyrophosphat reprimiert die Biosynthese des Thiazolteils und des Pyrimidinteils sowie in höherer Konzentration die Bildung der Enzyme des Synthetase-Systems. Zusätzlich hemmt der Thiazolteil seine eigene Biosynthese durch feed-back.

Bei anderen Organismen liegen keine genaueren Untersuchungen über die Regulation der Thiaminbiosynthese vor. Nur Versuche zur Akkumulatbildung können hier Anhaltspunkte liefern. Thiazol- und Thiaminmangelmutanten von Neurospora crassa [44,71,72] und Salmonella typhimurium [73,74,64-66] akkumulieren den Pyrimidinteil (siehe auch Abschnitt A.3.). Dagegen liegen zur Akkumulation des Thiazolteils unterschiedliche Ergebnisse vor: Mutanten von Salmonella typhimurium [74] und Aerobacter aerogenes [93] akkumulieren keine Thiazolverbindung, während Neurospora crassa-Mutanten [91] den Thiazolteil ins Medium abgeben (siehe auch Abschnitt A.4.). Vermutlich ist also die feed-back-Hemmung des Thiazolteils nicht bei allen Organismen verwirklicht.

Die vier Enzyme, die die Synthese des Thiaminphosphats aus dem Pyrimidin- und Thiazolteil katalysieren, werden bei E. coli bei einer Thiaminkonzentration von 5 µM in der Zelle vollständig dereprimiert. Bei einer zellulären Thiaminkonzentration von 18 µM setzt eine partielle Repression ein. Die Repression wird bei einem Thiaminspiegel von 35 µM vollständig [93a]. Es konnten zwei Mutanten isoliert werden, bei denen die Thiazolkinase und die Thiaminphosphatsynthase nicht durch Thiamin reprimierbar sind. Eine der beiden Mutanten wurde kartiert [93b].

6. Genetik.

Da Genetik und Biochemie sich in fruchtbarer Weise bei der Aufklärung von Biosynthesekette ergänzen können, soll noch kurz über die wenigen genetischen Arbeiten mit Thiaminmangelmutanten referiert werden.

E. coli K 12. Das Gen, das für die Biosynthese einer aktiven Thiaminphosphatpyrophosphorylase verantwortlich ist, liegt den Genen arg und met eng benachbart [94]. Ferner konnten Stouthamer et al. [70] den defekten Genlocus einer Mutante, die nach meinen eigenen Untersuchungen den Pyrimidin- und Thiazolteil zum Wachstum benötigt, zwischen dem Gen arg-2 auf der einen Seite und den Genen $adth_a$, ade_i und ade_k auf der anderen Seite kartieren.

Salmonella typhimurium. Bei Salmonella typhimurium lokalisierten Sanderson und Demerec [95] den Genlocus einer Thiaminmangelmutante, die sie aber nicht näher charakterisiert hatten. Der Locus dieser Mutante stimmt genau mit dem Locus einer von Parada und Ortega untersuchten Thiazolmutante überein [96]. Daher ist auch die von Sanderson und Demerec kartierte Mutante wahrscheinlich im Thiazolteil blockiert.

Saccharomyces. Mortimer und Hawthorne [97] konnten bei Saccharomyces eine nicht näher charakterisierte Thiaminmutante (th_1) im Fragment 6 kartieren.

Neurospora crassa. Die Ergebnisse von Versuchen zur Kartierung von Thiaminmangelmutanten bei Neurospora crassa faßt folgende Tabelle zusammen [98]:

Symbol	Kopplungsgruppe	Wachstumsbedarf
thi-1	I	Pyrimidin- und Thiazolteil
thi-2	III	Thiamin
thi-3	VII	Thiazolteil
thi-4	III	Thiamin

B. Problemstellung.

Aus obigen Ausführungen wird ersichtlich, daß die Biosynthese des Thiazol- und des Pyrimidinteils des Thiamins trotz zahlreicher Versuche zu ihrer Aufklärung noch weitgehend unbekannt ist. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zur Erweiterung der bisherigen Kenntnisse beizutragen. Hierzu wurden die Akkumulationsprodukte von Thiaminmangelmutanten und Enzyme, die an der Thiaminbiosynthese beteiligt sind, untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf Versuchen zur Aufklärung der Biosynthesekette des Pyrimidinteils.

C. Methoden.

1. Materialien.

Thiaminhydrochlorid (Schuchardt), Thiaminpyrophosphat (Merck), 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol (Hoffmann - La Roche), 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin-dihydrochlorid (Hoffmann - La Roche), Adenin (Merck) und Hypoxanthin (Boehringer) wurden ohne weitere Reinigung benutzt. 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin wurden dankenswerterweise von der Firma Takeda Chemical Industries, Ltd., Juso, Osaka (Japan), 2-Methyl-4-amino-5-methoxymethyl-pyrimidin und 2-Methyl-4-amino-5-chloromethyl-pyrimidin-dihydrochlorid von Merck, Sharp & Dohme (Rahway, N.J., USA) und 2-Methyl-4-amino-5-äthoxymethyl-pyrimidin von VEB Jenapharm (Jena) erhalten. Die 5-Hydroxymethyl-, 5-Chloromethyl- und 5-Methoxymethylderivate enthielten noch geringe Mengen gelber Verunreinigungen, die 5-Chloromethylverbindung außerdem größere Mengen des Hydroxymethylderivates. Sie wurden daher durch Verteilungschromatographie auf Sephadex G-25 fine und Gelchromatographie an Sephadex G-10 gereinigt. 2-Methyl-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-pyrimidin wurde durch 8-stündiges Erhitzen von 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin mit 5,7 N HCl bei 110° C hergestellt und anschließend durch Verteilungs- und Gelchromatographie gereinigt. Alle anderen Chemikalien waren p.A. und wurden ohne weitere Reinigung benutzt.

Folgende Säulenmaterialien kamen zur Verwendung:
Sephadex G-10, Sephadex G-25 fine (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden), Dowex 50 Wx8, 200 - 400 mesh, H^+-Form, prakt. rein (Serva, Heidelberg) und Aktivkohle gekörnt 1,5 mm und 0,3-0,5 mm (35 - 50 mesh ASTM) (Merck).

Sephadex G-10 wurde im Elutionsmittel gequollen, im Vakuum entlüftet, durch mehrmaliges Absetzenlassen und Dekantieren von feinen Partikeln befreit und im übrigen nach Flodin [99] behandelt. Sephadex G-25 fine wurde im Gemisch (Butanol-(1)/Eisessig/Wasser, 4:1:1) gequollen, durch mehrmaliges Absetzenlassen und Dekantieren äquilibriert und in allen weiteren Einzelheiten wie Sephadex G-10 behandelt [99]. Der Kationenaustauscher Dowex 50 Wx8, 200-400 mesh, wurde nach Moore und Stein [100] und Crampton et al. [101] vorbereitet und die Säule vor der Elution über Nacht mit dem Elutionsmittel äquilibriert.
Die gekörnte Aktivkohle (0,3 - 0,5 mm oder 1,5 mm) wurde in A. bidest. suspendiert, kurz bis zum Kochen erhitzt und anschließend durch mehrmaliges Abdekantieren von feinem Kohlenstaub befreit. Für jede Elution wurde frische Aktivkohle verwendet.

2. Geräte und gängige Methoden.

Für die spektroskopische Analyse wurden folgende Geräte verwendet:

UV-Spektroskopie: Registrierende Zeiss Spektralphotometer RPQ 20 A und DMR 21

IR-Spektroskopie: Leitz IR-Gitter-Spektralphotometer Modell IIIG mit der Mikroeinrichtung 6 : 1.

Massenspektrometrie: LK_B 9000 und CEC 21-110 [1].

Der pH der Puffer wurde mit dem Metrohm pH-Meter E 300 B und der Glaselektrode EA 120 X eingestellt.

1) Die massenspektrometrischen Analysen mit diesem Gerät wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Senn und Herrn Opferkuch in Heidelberg durchgeführt.

Die Trübungsmessungen wurden mit dem Eppendorf Photometer (Netheler & Hinz, Hamburg) bei 400 - 600 nm vorgenommen.

Die Eluate bei der Säulenchromatographie wurden mit Hilfe des Fraktionssammlers Ultrorac der Firma LKB-Produkter AB, Stockholm (Schweden), aufgefangen und gleichzeitig die Extinktion bei 260 nm mittels eines Schreibers laufend registriert.

Das Tricarb-Liquid-Scintillation-Spectrometer (Packard Instrument Co.) diente zur Messung der Radioaktivität der Tritiumproben. Folgendes Scintillatorgemisch kam zur Verwendung [102]: In 1 l Dioxan wurden 120 g Naphthalin, 4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 75 g POPOP (1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzol) gelöst.

Die papierchromatographische Analyse wurde aufsteigend auf dem Papier 214 ff der Firma Macherey, Nagel & Co, Düren, durchgeführt. Folgende Laufmittel kamen zur Verwendung:

1. Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1, v/v)
2. Butanol-(1), Eisessig, Äthanol, Wasser (100:24:10:50, v/v)
3. Isopropanol, konz. HCl, Wasser (170:41:39, v/v)
4. Isopropanol, konz. Ammoniak, Wasser (255:3,9:45, v/v)

Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte durch Ultraschall mit dem Sonifier der Fa. Branson Sonic Power (Model S 125) bei $+2^{\circ}C$.

Die Proteinbestimmung der Rohextrakte wurde mit der Biuret-

methode und Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt [103].

3. Medien.

Hefeminimalmedium:

0,875 g KH_2PO_4
0,125 g K_2HPO_4
0,5 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
0,1 g NaCl
0,1 g $CaCl_2$
1,0 g $(NH_4)_2SO_4$
10,0 g Rohrzucker

Spurenelemente:

500 µg H_3BO_3
40 µg $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
100 µg KJ
200 µg $FeCl_3 \times 6\ H_2O$
400 µg $MnSO_4 \times 4\ H_2O$
200 µg Ammoniummolybdat
400 µg $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$
ad 1 Liter deion. Wasser

Hefekomplettmedium:

10 g Yeast-Extrakt der Firma Difco
10 g Pepton
20 g Rohrzucker
ad 1 Liter deion. Wasser

Komplettmedium für Escherichia coli und Aerobacter aerogenes PD1:

8,0 g Nutrient Broth (Difco)
5,0 g NaCl
pro 1 Liter deion. Wasser

Minimalmedium für E. coli:

3,5 g K_2HPO_4
1,5 g KH_2PO_4
0,5 g Natriumcitrat x 5,5 H_2O
0,1 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
1,0 g $(NH_4)_2SO_4$
1,0 g Glucose
pro 1 Liter deion. Wasser

Das Minimalmedium für A. aerogenes PD1 enthielt zusätzlich 10 mg Adenin/l.

Saline: 5,0 g NaCl
0,12 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
ad 1 Liter deion. Wasser

4. Organismen.

Die Mutante PD1 (Purin, Pyrimidinteil des Thiamins) von Aerobacter aerogenes wurde dankenswerterweise von Dr. B. Magasanik erhalten. Zwei 4-Amino-imidazolribonucleosid akkumulierende Mutanten von E. coli K12, 0135 (thi, pur E) und 0150 (thi, his, tyr A, trp, pur C) wurden freundlicherweise von Herrn Dr. P.G. de Haan zur Verfügung gestellt. Alle anderen thiaminbedürftigen Mutanten von Saccharomyces cerevisiae S288C (haploid), sowie

von Escherichia coli K12 und Escherichia coli B sind früher im Institut von Herrn Prof. Dr. F. Lingens isoliert worden. Die E. coli- und A. aerogenes-Mutanten wurden monatlich, die S. cerevisiae-Mutanten vierteljährlich überimpft.

5. Klassifizierung der Mutanten.

Die Mutanten wurden über Nacht bei 30°C in 5 ml Komplettmedium angezüchtet. Am folgenden Tag wurden sie zweimal mit 5 ml sterilem Minimalmedium oder steriler Saline durch Abzentrifugieren und Resuspension gewaschen, in 5 ml sterilem Minimalmedium oder steriler Saline suspendiert und 1:100 verdünnt. Anschließend wurde je ein Tropfen dieser Suspension in sterile Kapsenberg-Röhrchen gegeben, die 5 ml Minimalmedium und je 2 µg folgender Zusätze / ml enthielten:

a) Thiaminhydrochlorid
b) 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol
c) 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin
d) 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol und 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin
e) Kein Zusatz (Kontrolle).

Das Wachstum wurde nephelometrisch bestimmt. Alle Versuche waren Doppelbestimmungen.

Einige Mutanten, die nach diesem Test als Pyrimidinmutanten bestimmt wurden oder in die Gruppe der Mutanten gehören, die den Thiazol- und Pyrimidinteil zum Wachstum benötigen, wurden in gleicher Weise getestet, ob sie folgende Pyrimidinderivate

zur Thiaminbiosynthese verwenden können:

(1) 2-Methyl-4_amino-5-methoxymethyl-pyrimidin

(2) 2-Methyl-4-amino-5-äthoxymethyl-pyrimidin

(3) 2-Methyl-4-amino-5-chloromethyl-pyrimidin

(4) 2-Methyl-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-pyrimidin

6. Kreuzfütterungsversuche (in Anlehnung an Dempsey und Pachler [104]). Die Mutanten wurden wie im Flüssigtest über Nacht bei 30°C in 5 ml Komplettmedium angezüchtet. Am folgenden Tag wurden sie zweimal mit je 5 ml sterilem Minimalmedium gewaschen und in 50 ml Minimalmedium suspendiert, in dem sie bis zum nächsten Tag inkubiert wurden, um ihre Thiaminreserven zu erschöpfen. Dann wurden sie abzentrifugiert, nochmals zweimal mit je 5 ml sterilem Minimalmedium gewaschen, in 5 ml sterilem Minimalmedium suspendiert und 1:100 verdünnt. Anschließend wurde je 1 ml dieser Suspension in sterile Petrischalen (C.A. Greiner & Söhne K.G., Nürtingen) gegeben und mit 15 ml Minimalagar vermischt. Die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert und als Paste auf den erstarrten Agar aufgetragen.

7. Akkumulationsversuche.
Vorversuche wurden in 0,5 l-Ansätzen bei 30°C (S. cerevisiae) bzw. 37°C (E. coli) unter Schütteln durchgeführt. Zur Isolierung der Akkumulationsprodukte wurde in 10 l-Fermentoren angezüchtet.

Bei den 0,5 l-Ansätzen bewährte sich folgendes Verfahren:
Die Anzucht der Mutanten erfolgte im Komplettmedium. Nachdem die

Zellen die stationäre Phase erreicht hatten, wurden sie abzentrifugiert, zweimal unter sterilen Bedingungen mit Minimalmedium gewaschen, im gleichen Volumen sterilem Minimalmedium suspendiert und bei 30°C bzw. 37°C über Nacht inkubiert.

Bei den Versuchen im größeren Maßstab (10 l) konnte auf Sterilität während der kurzen Akkumulationsperiode verzichtet werden, da sich gezeigt hatte, daß sich Infektionen, bei Hefen zum Teil wegen deren starker Säureproduktion, nicht durchzusetzen vermochten. Daher wurde zur Akkumulation frisch hergestelltes, nicht sterilisiertes Minimalmedium verwendet. Die Zellen wurden mit dem Klärseparator KDD 604 (mit geschlossenem Zulauf und Zweikammertrommel) der Fa. Westfalia Separator AG, Oelde, abgeschleudert [1].

a. Adsorption an Aktivkohle.

Die Akkumulation in Minimalmedium wurde über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und verworfen. Das Medium wurde über eine Kohlesäule, deren Volumen etwa 1/100 des Volumens des Mediums betrug, mit einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 10 l/h gegeben. Anschließend wurde die Säule mit etwa 10 Säulenvolumina A. bidest. gewaschen und mit 8-10 Säulenvolumina eines Äthanol-Wasser-(1:1)-Gemisches eluiert. Gelbes Material wurde hiermit nur in geringer Menge von der Säule desorbiert. Erst das Gemisch Äthanol-konz. Ammoniak-Wasser (25:10:65, v/v) konnte große Mengen an gelben Verbindungen von der Kohlesäule lösen.

1) Der Firma Westfalia Separator AG., Oelde, danken wir herzlichst für die Überlassung der Zentrifuge.

b. Erste Reinigung an Dowex 50 W x 8.

Die Adsorption an Aktivkohle und die anschließende Elution mit Äthanol-Wasser erwies sich als außerordentlich geeignet für die Isolierung der akkumulierten heteroxyclischen Verbindungen. Anfangs wurde jedoch eine andere Methode angewandt, und zwar wurde das Akkumulatgemisch an Dowex 50 W x 8, 200-400 mesh, in der H^+-Form, festgehalten und mit 3 N Ammoniak eluiert. Die Kapazität der Säule wurde so groß ausgelegt, daß die Austauschermenge etwa 1 1/2 mal so groß war wie diejenige, die zum Abfangen aller Kationen im Minimalmedium nötig gewesen wäre. 10 l Minimalmedium enthalten 285,5 m Äquivalente Kationen. Es kann angenommen werden, daß sich die Salzkonzentration des Mediums durch die Akkumulation nicht wesentlich ändert. Das Akkumulationsmedium wurde mit konz. HCl bis pH 2,0 (Spezialindikatorpapier) angesäuert und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 3 l/h über die Säule geschickt. Anschließend wurde mit A. bidest. gewaschen und mit 10 Säulenvolumina 3 N Ammoniak eluiert.

c. Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 W x 8.

Das Eluat der Aktivkohle- bzw. Dowex-Säule wurde zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 2 N HCl aufgenommen. Für Vorversuche wurde die Lösung an einer Säule Dowex 50 W x 8, 200-400 mesh, in der H^+-Form, (0,9 x 8,0 cm) mit 2 N HCl chromatographiert. Für Versuche, die das Ziel hatten, eine möglichst große Akkumulatmenge bis zur analytischen Reinheit zu bringen, wurden folgende Säulendimensionen gewählt: 1,5 x 25,0 cm.

d. Verteilungschromatographie an Sephadex G-25.

Die Fraktionen der Dowex-Chromatographie, die Wachstumsaktivität zeigten, wurden vereinigt und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in wenig A. bidest. aufgenommen, mit 0,1 N NaOH auf pH ca. 8-9 gebracht und wiederum zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde die Probe in 0,5 ml des Gemisches Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1, v/v) gelöst und auf eine Säule Sephadex G-25 fine (1,0 x 52,0 cm) aufgetragen. Eluiert wurde mit Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1, v/v).

e. Gelchromatographie an Sephadex G-10.

Die wachstumsaktiven Fraktionen der Verteilungschromatographie wurden vereinigt und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 0,5 ml 0,1 N Ammoniak gelöst und auf eine Säule Sephadex G-10 (1,0 x 101,2 cm) aufgetragen. Anschließend wurde mit 0,1 N Ammoniak eluiert.

f. Austestung der Fraktionen der einzelnen chromatographischen Trennungen auf Wachstumsaktivität.

Im Anschluß an die Ionenaustauschchromatographie auf Dowex 50 W x 8 mit 2 N HCl wurde ein Aliquot (0,03 bis 0,05 ml) von jeder Fraktion in ein steriles Kapsenbergröhrchen mit 5 ml Minimalmedium pipettiert. Wurde eine Hefemutante als Testmutante verwendet, so enthielt das Minimalmedium zur besseren Abpufferung etwaiger Säure- oder Basenüberschüsse die fünffache Phosphatkonzentration. Anschließend wurde die doppelte Menge (0,06 bzw. 0,1 ml) 1 N NaOH in jedes Röhrchen pipettiert. Daraufhin wurden die Röhrchen 15 min bedampft und 5 min bei 1 atm. autoklaviert. Nach dem Erkalten-

lassen wurde, wie unter 5. (Klassifizierung der Mutanten) beschrieben, mit einer verdünnten Suspension einer Pyrimidinmutante angeimpft.

Die Fraktionen der Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 konnten nicht direkt auf Wachstumsaktivität ausgetestet werden, da das Laufsystem (Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1, v/v) auch in kleinsten Konzentrationen für die verwendeten Mikroorganismen zu toxisch ist. Die Menge an 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin im Akkumulationsmedium der Thiazolmutante L 218 war jedoch so groß, daß die Verbindung durch ihre Absorption bei 260 nm bei der laufenden Registrierung der Extinktion des Eluates bei dieser Wellenlänge erkannt werden konnte.

Die Konzentrationen der 5- Methoxymethyl- und 5-Aminomethylderivate im Akkumulationsmedium waren allerdings so gering, daß die Empfindlichkeit des Uvicords nicht mehr ausreichte. In diesem Fall wurden die Fraktionen, die die beiden Derivate enthalten konnten, zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 ml A. bidest. aufgenommen und wie vorher beschrieben ausgetestet. Eine vorherige Chromatographie der Originalsubstanzen zeigte, welche Fraktionen die fraglichen Verbindungen enthalten mußten.
Die Fraktionen der Gelchromatographie an Sephadex G-10 mit 0,1 N Ammoniak wurden direkt ausgetestet, da die Pufferkapazität des Minimalmediums (bei Hefen mit 5-facher Phosphatkonzentration) ausreicht, um einen geringen Basenzusatz abzufangen.

g. Auffindung eines geeigneten Laufsystems zur Gelchromatographie an Sephadex G-10.

Da im Anschluß an die Gelchromatographie die Strukturaufklärung der gefundenen wachstumsaktiven Verbindungen einsetzen sollte, lag es nahe, für diesen chromatographischen Schritt eine flüchtige, verdünnte Elektrolytlösung oder sogar A. bidest. einzusetzen. Daher wurden die Verteilungskoeffizienten (K_d-Werte) der drei Pyrimidinverbindungen 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-, 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl- und 2-Methyl-4-amino-5-methoxymethyl-pyrimidin bei folgenden vier Laufmitteln untersucht (die Säulendimensionen sind in Klammern angegeben):

(1) A. bidest. (1,0 x 102 cm)
(2) 0,5 N Ameisensäure (1,0 x 96,1 cm)
(3) 0,5 N Essigsäure (1,0 x 103 cm) und
(4) 0,1 N Ammoniak (1,0 x 109 cm).

Das äußere Volumen (V_a) wurde mit Dextranblau 2000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden), das innere Volumen (V_i) mit Tritium-Wasser (Tracerlab, Waltham, Mass., USA) bestimmt. Das Elutionsvolumen (V_e) stellt die Eluatmenge dar, die nach dem Auftragen der Substanz bis zum Erscheinen ihrer maximalen Konzentration im Eluat die Säule verläßt.

8. Versuche zur Repression der Biosynthese des Pyrimidinteils durch Thiamin bei E. coli.

In Anlehnung an Newell und Tucker [73] wurde die Thiazolmangelmutante L 218 von E. coli über Nacht in Minimalmedium, das

0,1 % Glucose und 0,02 mg des Thiazolteils/l enthielt, vorgezüchtet. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit Minimalmedium, das die gleichen Zusätze enthielt, 1 : 1 verdünnt und durch Zusatz von 300 mg Adenosin/l die weitere Thiaminsynthese durch Repression der Purinbiosynthese gehemmt. Die Zellkultur wurde anschließend 2,5 h bei 37°C geschüttelt. Im Repressionsversuch wurde dem Praeinkubationsmedium 0,02 mg Thiaminhydrochlorid/l zugesetzt.

Nach 2,5 h wurde die Kultur schnell auf +2°C abgekühlt. Die Zellen wurden in der Kühlzentrifuge bei +2°C abzentrifugiert und zweimal mit Saline gewaschen. Die anschließende Inkubation der Zellen erfolgte in Minimalmedium ohne Zusätze bei 37°C unter Schütteln. Die Verdünnung wurde so eingestellt, daß die Trübung zu Beginn der Inkubation die Extinktion 0,5 (1 cm Lichtweg) hatte. Aliquots von 1 ml wurden nach 0,5, 1,0 und 1,5 h entnommen und 5 min auf 100°C erhitzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Pyrimidingehalt mikrobiologisch mit der S. cerevisiae-Mutante HK 210 bestimmt. Da diese Mutante auch mit Thiamin wächst, wurden die Werte durch Bestimmung des Thiamingehaltes mit der Mutante N 174 korrigiert.

9. Enzymatische Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der gefundenen Pyrimidinderivate.

a. Herstellung roher Enzymextrakte aus S. cerevisiae und E. coli.

S. cerevisiae: Die Kulturen wurden in 1 l Erlenmeyerkolben in 0,5 l Minimalmedium + 0,005 mg/l des Thiazolteils (HK 302) bzw. des Pyrimidinteils (HK 210) bei 30°C gezüchtet und in der späten loga-

rithmischen Wachstumsphase geerntet. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und bei -30°C eingefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen mit der 1,5-fachen Menge an vorgekühltem Aluminiumoxid (Alcoa A 305, Geralco, Frankfurt) in einer ebenfalls vorgekühlten Reibschale bei +1°C im Kühlraum verrieben, bis ein dickflüssiger Zellbrei entstand. Dieser wurde mit kaltem Phosphatpuffer, 0,1M, pH 7,0, aufgeschlemmt. Die Suspension wurde durch Zentrifugieren bei 18.000 g und +4°C von Aluminiumoxid und Zellrückständen befreit.

Um Repressionsbedingungen in der Wachstumsphase zu schaffen, wurden dem Minimalmedium 0,1 mg Thiaminhydrochlorid statt des Thiazol- bzw. Pyrimidinteils zugesetzt oder die Zellen in Komplettmedium gezüchtet.

E. coli: Die Anzucht erfolgte in 1 l Erlenmeyerkolben in 0,5 l Minimalmedium mit 0,005 mg/l des Thiazolteils (L 218) bzw. des Pyrimidinteils (R 4685) /1. Für die Repressionsversuche wurde Minimalmedium mit einem Zusatz von 0,1 mg Thiaminhydrochlorid oder Komplettmedium verwendet. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet, mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, zweimal gewaschen und anschliessend im gleichen Puffer aufgerührt, so daß eine 20%ige Suspension (20 g feuchte Zellen in 100 ml Puffer) entstand. Zum Zellaufschluß wurde bei +2°C fünfmal 10 sec lang beschallt. Anschließend wurde bei 18.000 g und 4°C zentrifugiert.

b. Enzymansatz.

Die Rohextrakte wurden über Nacht in Visking-Schläuchen gegen 0,1 M Phosphatpuffer, 5×10^{-5} M an Dithiotreitol, dialysiert. Die enzymatischen Versuche wurden in 5 ml-Ansätzen durchgeführt. Diese enthielten:

0,5 ml rohen dialysierten Enzymextrakt,
1,0 mM Phosphatpuffer, pH 7,0,
0,05 mM $MgCl_2$ und
0,05 mM Substrat (2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin, bzw. 2-Methyl-4-amino-5-methoxymethyl-pyrimidin).

Im Blindversuch wurde ein 5 min auf 100°C erhitzter Enzymextrakt dem Inkubationsansatz zugesetzt.

Es wurde bei 37°C inkubiert und nach 15 min, 30 min, 1 h und 3 h je 1 ml der Inkubationslösung entnommen. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 100°C gestoppt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert.

c. Aufarbeitung des Inkubationsansatzes.

0,5 ml der proteinfreien Lösung wurden zur Trockne eingeengt und zu dem Rückstand 0,5 ml des Systems Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1, v/v) gegeben. Hierbei lösten sich die Pyrimidinderivate und ein geringer Teil des Phosphatpuffers. Der Überstand wurde auf eine Säule Sephadex G-25 fine aufgetragen und, wie in Absatz 7.d. beschrieben, chromatographiert. Diejenigen Fraktionen, mit denen

die 5-Hydroxymethylverbindung eluiert wird, wurden vereinigt und zur Trockne eingeengt.

Der Rückstand wurde in 0,5 ml 0,1 N Ammoniak aufgenommen und der Gelchromatographie an Sephadex G-10, wie in Absatz 7.e. beschrieben, unterworfen. Diejenigen Fraktionen, in denen sich das 5-Hydroxymethylderivat befand, wurden wiederum vereinigt und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml A. bidest. aufgenommen und seine Konzentration an 5-Hydroxymethyl-pyrimidin mikrobiologisch bestimmt. Hierzu wurde 0,1 ml in ein 5 ml Minimalmedium enthaltendes Kapsenbergröhrchen pipettiert und, wie schon in Absatz 7.f. beschrieben, kurz autoklaviert und mit einer verdünnten Suspension der Pyrimidinmutante HK 210 von S. cerevisiae beimpft. Diese Versuche, sowie die Eichkurve waren Dreifachbestimmungen.

10. Darstellung und enzymatische Umsetzung des 5-Amino-imidazol-ribonucleotids.

Die E. coli-Mutante 0135 wurde über Nacht in Minimalmedium mit 14 mg Hypoxanthin/1, 0,005 mg Thiaminhydrochlorid/1 und 2 % Glucose unter starkem Schütteln bei 37°C gezüchtet. Zum Animpfen (1:200) dienten Zellen, die im gleichen Medium ohne Schütteln gewachsen waren. Die Zellen von 4 l wurden abzentrifugiert und in einem Medium, das mit 2 % Glucose und je 1 mMol/l Glycin, Natriumformiat und L-Glutamin supplementiert war, 3 h lang intensiv geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit A. dest. gewaschen und in wenig A. bidest. zu einer dickflüssigen Suspension aufgeschlemmt. Der Zellaufschluß erfolgte durch einminütiges Beschallen bei 0°C, während mit -30°C kaltem Methanol gekühlt wurde.

Unmittelbar danach wurde die Suspension in ein Glasgefäß geschüttet, das in kochendem Wasser stand. Unter Umrühren wurde die Lösung 3 min lang bei 100°C erhitzt und wiederum sofort anschließend auf +4°C abgekühlt. Die Zellrückstände und das ausgefallene Protein wurden durch Zentrifugieren bei 18.000 g und +4°C entfernt.

Die erhaltene Lösung wurde durch Lyophilisation zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in wenig A. bidest. aufgenommen und der Gelchromatographie an Sephadex G-15 (2,0 x 76,3 cm) mit A. bidest. als Laufmittel unterworfen. Sämtliche Arbeitsgänge wurden bei 2°C im Kühlraum durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung des 5-Amino-imidazol-ribonucleotids wurde die Bratton-Marshall-Reaktion [105] auf Arylamine herangezogen. Nacheinander wurden in ein Reagenzglas pipettiert:

0,1 ml aus einer Fraktion der Gelchromatographie,
1,8 ml A. bidest.,
0,1 ml 4 N HCl,
0,2 ml einer 0,1 %igen Natriumnitritlösung,
0,2 ml einer 0,5 %igen Amidosulfonsäurelösung,
0,2 ml einer 0,1 %igen Lösung von N-(1-naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid.

Die Extinktion des entstandenen orangefarbenen Chromophors wurde bei 497 nm gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration wurden vereinigt und wiederum durch Lyophilisation zur Trockne gebracht, um im folgenden Enzymversuch als Substrat eingesetzt zu werden.

Der Chromophor hat bei 500 nm einen Extinktionskoeffizienten von 24.600 [106]. Mit dessen Hilfe konnte die Konzentration an 5-Amino-imidazol-ribonucleotid im Eluat bestimmt werden.

Der Gehalt an organisch gebundenem Phosphat wurde nach 1,5-stündigem Erhitzen bei 150°C in 10 N H_2SO_4 [107] nach Fiske und Subbarow [108] bestimmt.

Um das 5-Amino-imidazol-ribonucleotid enzymatisch in den Pyrimidinteil umzuwandeln, wurden, wie schon beschrieben, Enzymextrakte der Thiazolmutante L 218 von E. coli und der Pyrimidinmutanten HK 354 und HK 210 von S. cerevisiae hergestellt. Lediglich die anschließende Dialyse wurde weggelassen. Die Mutanten waren in Minimalmedium mit 300 mg Adenosin/l und 0,005 mg Thiaminhydrochlorid/l unter Schütteln bei 37°C angezüchtet worden. Der Inkubationsansatz (5 ml) enthielt:

1,0 ml rohen, nicht dialysierten Enzymextrakt,
1,0 mM Phosphatpuffer, pH 7,0,
0,05 mM $MgCl_2$,
0,1 mM L-Methionin,
0,1 mM ATP und
0,02 mM durch Gelchromatographie gereinigtes 4-Amino-imidazol-ribonucleotid.

Im Blindversuch wurde ein 5 min gekochter Enzymextrakt dem Inkubationsmedium zugesetzt. Aliquots von 1 ml wurden nach 30 min,

1, 2 und 5 h entnommen und 5 min auf 100°C erhitzt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und die Konzentration an 5-Hydroxymethyl-pyrimidin in der Lösung mikrobiologisch mit der Mutante HK 210 von S. cerevisiae bestimmt. Da diese Mutante auch mit Thiamin wächst, wurden die Werte durch Bestimmung des Thiamingehaltes mit der Mutante N 174 korrigiert.

11. Akkumulationsversuche mit der Mutante HK 210 von S. cerevisiae.

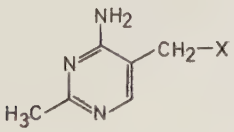
Die Anzucht erfolgte bei 30°C in Komplettmedium. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in Minimalmedium suspendiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschleudert und das Medium über eine Kohle-Säule gegeben. Das Volumen der Kohle-Säule betrug etwa ein Zehntel desjenigen des Akkumulationsmediums. Die wachstumsaktive Verbindung wurde mit Äthanol/Wasser (1:1) von der Kohle eluiert und die erhaltene Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in wenig 0,5 M Ammoniak aufgenommen und die Lösung auf einer Säule Sephadex G-10 (1,0 x 109 cm) mit 0,5 M Ammoniak chromatographiert. Eine Fraktion enthielt 30 Tropfen. Die wachstumsaktiven Fraktionen wurden eingeengt und der Rückstand in 0,5 M Essigsäure aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit 0,5 Essigsäure auf einer Säule Sephadex G-10 (1,0 x 103 cm) chromatographiert. Wiederum enthielt jede Fraktion 30 Tropfen.

D. Ergebnisse und Diskussion.

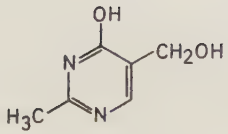
1. Klassifizierung der Mutanten.

Mit Hilfe einfacher Wachstumsversuche konnten die vorhandenen Thiaminmutanten in drei Gruppen eingeteilt werden, je nachdem, ob sie den Thiazolteil, den Pyrimidinteil oder beide zum Wachstum benötigten (siehe Tab. 1). Eine vierte Gruppe von Mutanten, nämlich solche, die nur mit Thiamin allein wachsen können, wurde nicht gefunden. Gründe hierfür können nicht angegeben werden, denn zur Bildung des Thiamins aus dem Thiazol- und Pyrimidinteil sind allein fünf Enzyme erforderlich.

Ferner wurde untersucht, welche Pyrimidinderivate das 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin im Wachstumstest ersetzen können. Die Derivate X, XI, XIV und XV sowie das 2-Methyl-4-hydroxy-5-hydroxy-methyl-pyrimidin (XVI) wurden für diese Versuche eingesetzt.



X = II. OH
X. OCH_3
XI. NH_2
XIV. OC_2H_5
XV. Cl



XVI

Tabelle 1

Klassifizierung der untersuchten Mutanten von S. cerevisiae und E. coli.

S. cerevisiae:

Thiazolmutanten: G 28, HK 123, HK 278, HK 291, HK 300, HK 302, HK 356, HK 446, HK 457.

Pyrimidinmutanten:

P1-Mutanten: 8 D, E 10, E 97, E 124, E 190, HK 23, HK 354.

P2-Mutanten: G 2, G 23, E 78, E 93, E 112, E 184, KP 452, HK 41, HK 43, HK 143, HK 194, HK 210, HK 460, HK 471.

Mutanten, die den Pyrimidin- und Thiazolteil zum Wachstum benötigen (PT-Mutanten):

N 31, N 49, N 174, HK 148, HK 200, HK 318, HK 360, HK 362, HK 442, HK 463.

E. coli B:

Pyrimidinmutante: L 214

Thiazolmutante: L 218

E. coli K 12:

Pyrimidinmutante: K 4685

PT-Mutanten: 0135, 0150 (beide von Dr. P.G. de Haan)

Tabelle 2

Wachstumswirksamkeit der Pyrimidinderivate II, X, XI, XIV, XV und XVI bei verschiedenen Mutanten und Organismen.

Organismus Mutante (Herkunft)	Gruppe	II	X	XI	XIV	XV	XVI
S. cerevisiae							
HK 210	P2	+	+	+	+	+	-
HK 354	P1	+	+	+	+	+	-
N 174 +	PT	+	+	+	+	+	-
A. aerogenes (B. Magasanik)							
PD1 ++	Pyr+Pur	+	+	+	+	+	-
E. coli							
L 214	Pyr	+	+	+	+	+	-

\+ zusammen mit dem Thiazolteil ausgetestet

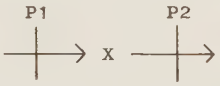
++ zusammen mit Adenin ausgetestet.

Wie Tabelle 2 zusammenfassend veranschaulicht, sind die in 5-Stellung abgewandelten Derivate X, XI, XIV und XV voll wachstumswirksam, während das 4-Hydroxyderivat XVI nicht fütterungswirksam ist. Diese Resultate stimmen mit den Untersuchungen anderer Autoren überein [35,31,39]. In der Literatur ist nur eine

Mutante beschrieben worden, die diesem Schema zur Fütterungswirksamkeit von Pyrimidinderivaten nicht gehorcht. Es handelt sich um die Purin-Thiamin-Mutante ATh4 von Salmonella typhimurium, die das 5-Amino-methyl- und 5-Methoxymethylderivat nicht in das 5-Hydroxymethylderivat umwandeln kann [17].

2. Kreuzfütterungsversuche.

Um eine weitere Gruppierung der Thiaminmutanten von S. cerevisiae zu erzielen, wurden Kreuzfütterungsversuche unternommen. Mit ihrer Hilfe konnten die Pyrimidinmutanten in zwei Gruppen, P1 und P2, unterteilt werden, wobei die Mutanten der Gruppe P2 die der Gruppe P1 füttern (siehe Tab. 3)



In einigen Fällen wurde um die Zellmasse der fütternden Mutante eine kreisförmige Hemmzone beobachtet, an die sich der milchige Ring der gefütterten Mutante anschloß. Möglicherweise läßt sich diese Erscheinung mit der Beobachtung erklären, daß im Akkumulationsmedium vieler Hefemutanten Adenosin zu finden ist, das hemmend auf das Wachstum aller Thiaminmutanten wirkt.

Die Thiazolmutanten von S. cerevisiae konnten durch Kreuzfütterungsversuche nicht weiter unterteilt werden.

Die Pyrimidinmutanten L 214 und K 4685 von E. coli füttern sich nicht gegenseitig.

Die Pl-Mutanten von S. cerevisiae sind mit Ausnahme der Mutante HK 354 alle stark leaky.

Tabelle 3

Kreuzfütterungsphänomene unter den Pyrimidinmutanten von S. cerevisiae

fütternde Mutanten	gefütterte Mutanten: 8 D	E 10	E 97	E 124	E 190	HK 23	HK 354	G 2	G 23	E 78	E 93	E 112	E 184	KP 452	HK 41	HK 43	HK 143	HK 194	HK 210	HK 460	HK 471
8 D	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 10	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 97	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 124	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 190	-	-	o	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 23	-	-	o	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 354	-	-	o	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
G 2	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 23	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 78	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E 93	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 112	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 184	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KP 452	+	+	o	+	o	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 41	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 43	+	+	o	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 143	+	+	o	+	o	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 194	+	+	o	+	o	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hk 210	+	+	o	+	o	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 460	+	+	o	+	o	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK 471	+	+	o	+	o	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3. Akkumulation der Pyrimidinderivate.

Sowohl Thiazolmutanten von S. cerevisiae und E. coli als auch Mutanten von S. cerevisiae, die den Pyrimidin- und Thiazolteil zum Wachstum benötigen, wurden unter Akkumulationsbedingungen gezüchtet. Anschließend konnten nicht nur Pyrimidinderivate im Medium gefunden werden, sondern ebenso die verschiedensten Purin- und Pyrimidinbausteine, in wenigen Fällen sogar Thiaminpyrophosphat.

a. Akkumulationsversuche mit der Mutante N 174 von S. cerevisiae.

Diese Mutante benötigt den Pyrimidin- und Thiazolteil zum Wachstum. Unter Akkumulationsbedingungen gibt sie unter anderem Adenosin und Thiaminpyrophosphat ans Medium ab. Adenosin wurde durch Ionenaustausch- und Gelchromatographie gereinigt. Hiernach zeigte es das gleiche UV-Spektrum, die gleichen R_F-Werte in den Chromatographiesystemen 1 bis 4 und nahezu das gleiche Massenspektrum wie die authentische Substanz. Thiaminpyrophosphat wurde nach den gleichen Reinigungsschritten mit Hilfe der vergleichenden Papierchromatographie in den Systemen 1 bis 3 und des UV-Spektrums identifiziert. Außerdem fütterte die isolierte Substanz alle drei gefundenen Gruppen von Thiaminmutanten.

b. Akkumulationsversuche mit Thiazolmutanten von S. cerevisiae.

Von dieser Gruppe wurden vier Mutanten untersucht: HK 123, HK 278, HK 291 und HK 300. Unter Minimalbedingungen zeigten sie alle das gleiche Akkumulationsmuster, das außerdem demjenigen der Mutante N 174 sehr ähnlich sah. Wie N 174 geben die vier Mutanten Adenosin und Thiaminpyrophosphat ans Medium ab. Beide Verbindungen

wurden wie vorher beschrieben identifiziert. Zusätzlich wurden zwei unbekannte wachstumsaktive Substanzen, A und B, ans Medium abgegeben. Substanz A füttert nur die Pyrimidinmutanten, Substanz B außerdem die Thiazolmutanten und die Mutanten, die beide Teile des Thiaminmoleküls zum Wachstum benötigen. Die erste Verbindung zeigte bei der aufsteigenden Papierchromatographie mit den Laufsystemen 1 und 2 die R_F-Werte 0,25 bis 0,26 bzw. etwa 0,40, die zweite mit den gleichen Chromatographiesystemen die R_F-Werte 0,36 bzw. etwa 0,52. Die ausgeschiedenen Mengen beider Substanzen waren jedoch viel zu gering, als daß man sie näher hätte charakterisieren können. Durch die Papierchromatographie konnte aber sichergestellt werden, daß sie nicht mit dem Pyrimidinteil oder einem seiner uns zur Verfügung stehenden Derivate identisch sind.

Das Auftreten von Adenosin im Akkumulationsmedium wurde schon bei Mutanten der Aromatenbiosynthese beschrieben und auf eine teilweise Lysis der Hefezellen zurückgeführt [109]. Es ist möglich, daß diese Erklärung auch auf das Erscheinen des Thiaminpyrophosphates unter Minimalbedingungen angewendet werden kann. Andernfalls müßten die Thiaminmangelmutanten das von ihnen dringend benötigte Thiaminpyrophosphat ins Medium ausscheiden. Unerklärlich bleibt jedoch, warum nur Adenosin und keine oder nur sehr geringe Mengen anderer Nucleinsäurebausteine im Akkumulationsmedium zu finden sind.

c. Akkumulationsversuche mit der Thiazolmutante L 218 von E. coli.

Das Muster der von dieser Mutante akkumulierten Verbindungen war von dem der vorher untersuchten Hefemutanten außerordentlich ver-

schieden. Weder Adenosin noch Thiaminpyrophosphat konnte im Medium nachgewiesen werden. Die papierchromatographische Analyse mit den Systemen 1 bis 3 zeigte, daß im Eluat der Kohlesäule drei wachstumsaktive Verbindungen vorhanden waren (s. Tab.4). Ihre R_F-Werte deuteten darauf hin, daß es sich um das 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin und seine beiden 5-Methoxymethyl- und 5-Aminomethyl-derivate handeln könnte.

Tabelle 4

R_F-Werte der für die S. cerevisiae-Mutante HK 210 wachstumsaktiven Verbindungen im Akkumulationsmedium der Thiazolmutante L 218 und die R_F-Werte von 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin, seinen 5-Aminomethyl- und 5-Methoxymethylderivaten in den Laufsystemen 1 bis 3.

	Laufsystem		
	1	2	3
Substanz 1	0,22	0,57	0,26
Substanz 2	0,61	0,68	0,68
Substanz 3	0,79	0,84	0,81
5-Hydroxymethyl-pyrimidin	0,61	0,70	0,69
5-Methoxymethyl-pyrimidin	0,78	0,85	0,81
5-Aminomethyl-pyrimidin	0,20	0,56	0,27

Laufsystem 1 : Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1)

2 : Butanol-(1), Eisessig, Äthanol, Wasser (100:24:10:50)

3 : Isopropanol, konz. HCl, Wasser (170:41:39)

In je einer Probe aus drei verschiedenen Akkumulationsansätzen der Thiazolmutante L 218 wurde die Gesamtkonzentration an akkumulierten Pyrimidinen bestimmt. Hierzu wurden die Pyrimidinmangelmutanten R 4685 von E. coli und HK 210 von S. cerevisiae, sowie die Grundzweigmutante PD1 von A. aerogenes herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5

Gesamtkonzentration der von der Thiazolmutante L 218 akkumulierten Pyrimidinderivate.

Testmutante	Konzentration in µg/l		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
E. coli R 4685	210	200	210
S. cerevisiae HK 210	190	180	200
A. aerogenes PD1 +	220	210	220

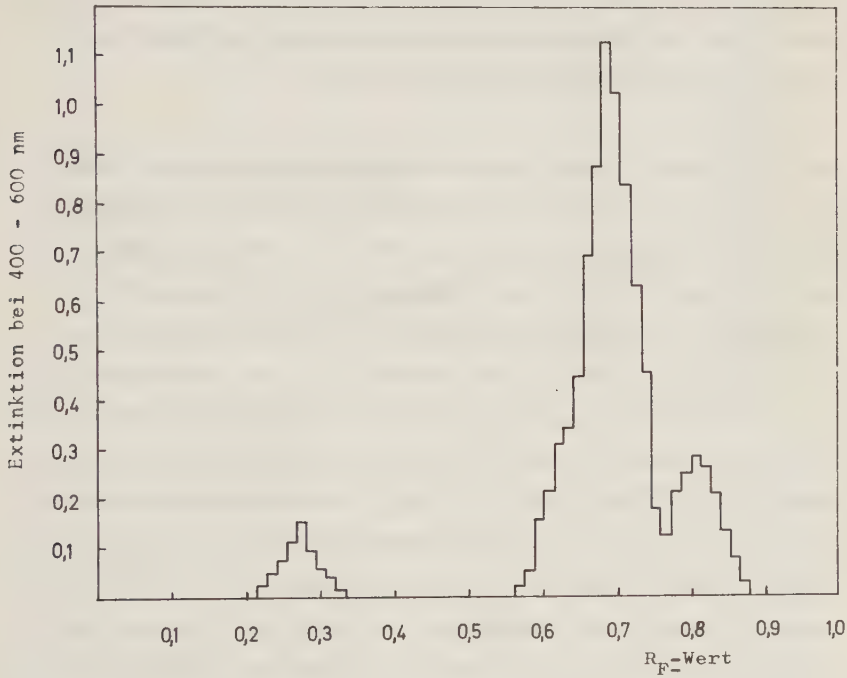
+ mit Adenin ausgetestet.

Die Konzentrationen der drei Pyrimidinderivate im Akkumulationsmedium waren allerdings sehr unterschiedlich. Genauere Bestimmungen wurden in diesem Fall nicht vorgenommen. Das folgende Bioautogramm (s. Abb. 1) zeigt jedoch anschaulich, daß das Hauptakkumulationsprodukt eine Verbindung ist, die im Laufsystem Isopropanol, konz. HCl, Wasser (170:41:39) einen R_F-Wert von 0,68

hat. Die anderen beiden Pyrimidinderivate liegen in einer wesentlich geringeren Konzentration vor.

Abb. 1

Bioautographie der von der Thiazolmutante L 218 akkumulierten Pyrimidinderivate. System Isopropanol, konz. HCl, Wasser (170: 41:39), aufsteigend. Test: nephelometrisch mit der Pyrimidinmutante HK 210 von S. cerevisiae.



Nur etwa 80-90 % der im Akkumulationsmedium vorhandenen Menge an Pyrimidinderivaten konnten mit dem Äthanol-Wasser-Gemisch von der Kohlesäule desorbiert werden. Eine vollständige Wiedergewinnung der Pyrimidine gelang erst mit dem Gemisch Äthanol-konz.Ammoniak-

Wasser (25:10:65, v/v), jedoch wurden gleichzeitig große Mengen verunreinigenden Materials, unter anderem gelbe bis braune Verbindungen, von der Säule gelöst. Aus diesem Grunde wurde auf eine quantitative Ausbeute bei der Adsorptionschromatographie an Kohle verzichtet. Neben einem Teil der organischen Stoffwechselprodukte, die die Zellen unter Minimalbedingungen ans Medium abgeben, konnten alle Salze und Zucker durch diesen Schritt entfernt werden. Die gekörnte Kohle (0,3-0,5 oder 1,5 mm) erwies sich hierbei der herkömmlichen pulvrigen Aktivkohle überlegen, weil das Medium und das Elutionsmittel die Säule mit weit größerer Geschwindigkeit passieren konnten.

Die sich anschließende Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 W x 8 mit 2 N HCl als Elutionsmittel brachte eine weitere Reinigung der Pyrimidinderivate sowie ihre Trennung voneinander. Die Abbildung 2 zeigt ferner, daß neben den Pyrimidinderivaten verschiedene Nucleinsäurebausteine während der Akkumulationsphase im Medium auftreten und ebenfalls von der Kohlesäule eluiert werden. Im einzelnen konnten Uracil, Xanthin und Hypoxanthin durch vergleichende Ionenaustauschchromatographie an derselben Säule mit demselben System (2 N HCl), vergleichende Papierchromatographie, UV-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert werden. Von der Säule mit den Dimensionen 0,9 x 8,0 cm wurde Uracil mit den Fraktionen 4 und 5 eluiert, Xanthin mit den Fraktionen 6 bis 8 und Hypoxanthin mit den Fraktionen 9 bis 11.

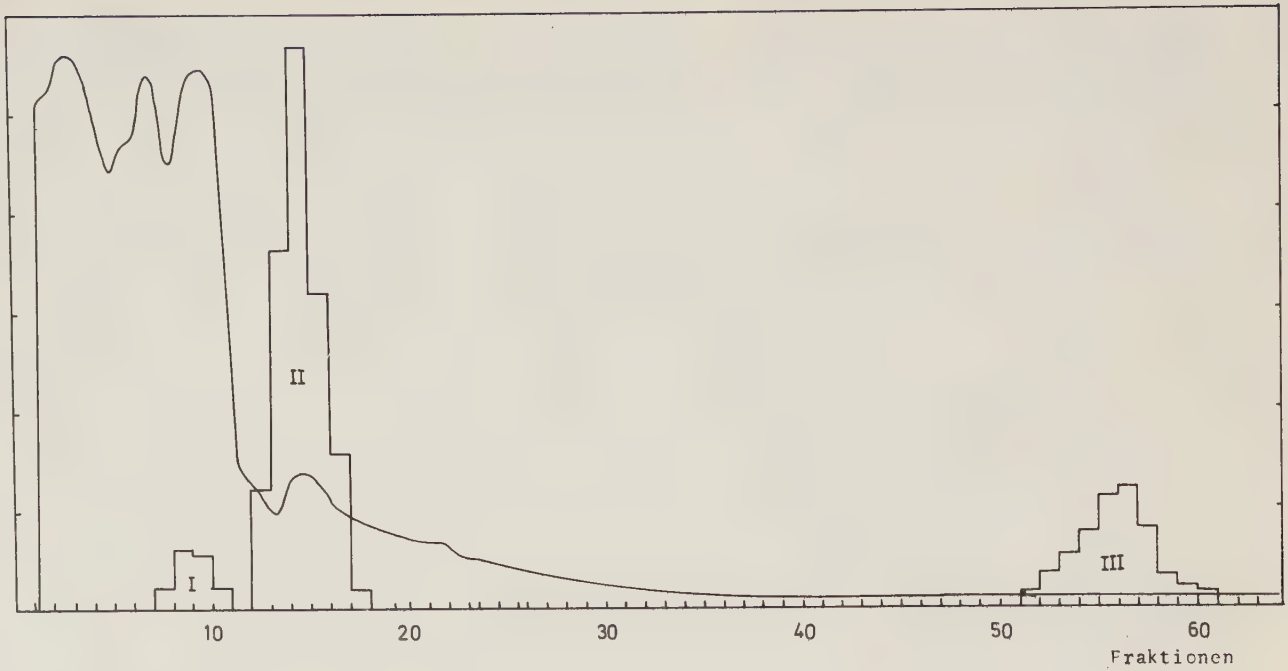


Abb. 2

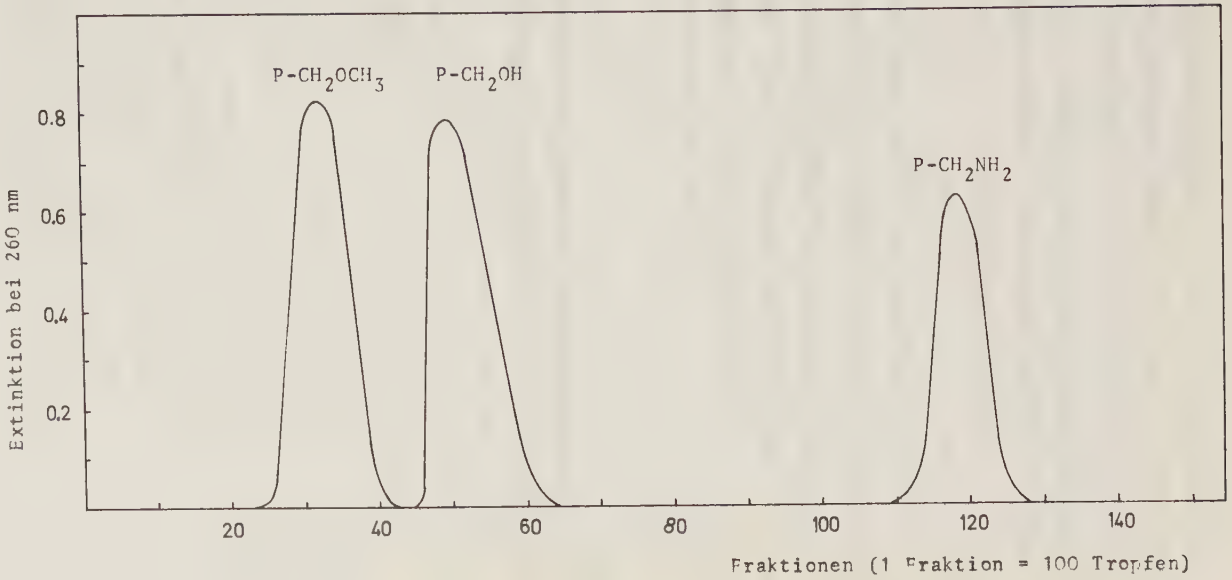
Ionenaustauschchromatographie der von der Kohlesäule eluierten Pyrimidinderivate an Dowex 50 W x 8, 200-400 mesh, H^+-Form, (0,9 x 8,0 cm), mit 2 N HCl. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität wurde ein Aliquot jeder Fraktion zusammen mit der doppelten Menge 1 N NaOH in Kapsenbergröhrchen mit 5 ml Minimalmedium pipettiert. Nach kurzem Autoklavieren wurde mit der Pyrimidinmutante HK 210 angeimpft.

Schon bald nach der Einführung der Dextrangele zur Trennung von Molekülgemischen nach deren Größe wurde ihre Bedeutung als Träger der stationär hydrophilen Phase bei der Verteilungschromatographie erkannt. Sofern man nicht große Moleküle voneinander trennen wollte, wurde in den meisten Fällen Sephadex G-25 verwendet. Dieses Gel quillt im Laufsystem Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1) erheblich weniger als in Wasser. Durch häufiges Dekantieren wird ein Gleichgewichtszustand erreicht, der darin besteht, daß sich im Inneren des hydrophilen Gels mit Butanol gesättigte Essigsäure und in der äußeren Phase mit Essigsäure gesättigtes Butanol befinden. Die Tropfgeschwindigkeit beeinflußt die Trennung nicht wesentlich. Ferner scheinen Sättigungsphänomene bei Sephadex G-25, das aus neutralen Polysacchariden aufgebaut ist, keine Rolle zu spielen. Im Gegensatz zur Verteilungschromatographie an Zellulosepulver erhält man mit Sephadex horizontale Strömungsfiguren. Diese Vorteile haben der Verteilungschromatographie an Sephadex eine breite Anwendung zuteil werden lassen (Übersicht bei [110]).

Die Abbildung 3 veranschaulicht ein typisches Elutionsdiagramm einer Säule Sephadex G-25 (1,0 x 52,0 cm), auf die je 2 mg der Basen 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin, 2-Methyl-4-amino-5-methoxymethyl-pyrimidin und 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin aufgetragen wurden. Die drei Verbindungen wurden gut voneinander getrennt. Die Elutionskurven der ersten beiden Pyrimidin-derivate waren glockenförmig, nur die der 5-Hydroxymethyl-verbindung zeigte keine Symmetrie. Die Reihenfolge der eluierten Verbindungen, sowie ihr Abstand voneinander war so, wie man es von der Papierchromatographie im gleichen System erwarten konnte.

Abb. 3

Verteilungschromatographie von 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin sowie seinem 5-Aminomethyl- und 5-Methoxymethylderivat (ca. je 2 mg) an Sephadex G-25 (1,0 x 52,0 cm) mit Butanol-(1), Eisessig, Wasser (4:1:1, v/v).

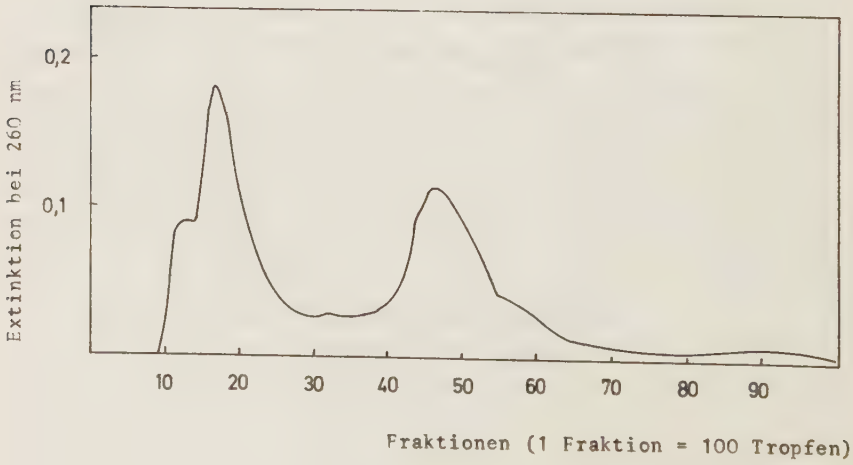


Von der Dowex-Säule wurden drei wachstumsaktive Fraktionen eluiert. Jede dieser Fraktionen wurde anschließend durch eine Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 fine weiter gereinigt. Die Abbildung 4 gibt das Elutionsdiagramm von Fraktion II wieder. Der Peak, der mit den Fraktionen 45 bis 60 eluiert wurde, enthielt die gesamte Wachstumsaktivität.

Bei der Verteilungschromatographie der Dowex-Fraktionen I und III konnte keine nennenswerte Extinktionszunahme beobachtet werden. Die biologische Austestung der Fraktion I ergab, daß sich wachstumsaktive Substanz in den Röhrchen 27 bis 37 befand. Für Fraktion III wurde die Wachstumsaktivität in den Röhrchen 112 bis 123 gefunden.

Abb. 4

Verteilungschromatographie von Fraktion II der Ionenaustauschchromatographie an Dowex. Elutionsbedingungen wie in Abb. 3.



Die Gelchromatographie an den hochvernetzten Sephadex-Typen G-10, G-15 und G-25 wird wegen ihrer Einfachheit zur Trennung niedermolekularer Verbindungen seit einigen Jahren in steigendem Maße angewendet. Aromatische und heterocyclische Verbindungen besitzen eine mit steigendem Vernetzungsgrad zunehmende Affinität zum Gel und erscheinen später im Eluat als gleich große und gleich geladene gesättigte Moleküle. Die vernetzenden Ätherbrücken im Gel sind hierbei für die aromatische Adsorption verantwortlich [111]. Durch Zusatz einer größeren Menge einer aromatischen oder heterocyclischen Verbindung zum Elutionssystem wird die Adsorption durch Verdrängung von den Äthergruppen verhindert [111,112].

Bei der Gelchromatographie spielen neben der reinen Adsorption zusätzliche Effekte wie die Ionenstärke und der pH-Wert des Eluates sowie die Wirkungen der wenigen Carboxylgruppen im Gel eine bedeutende Rolle. Hoch geladene Moleküle, die von einer großen ionischen Doppelschicht umgeben sind, werden vom Gel ausgeschlossen. Daher hat in den meisten Fällen eine drastische pH-Änderung einen starken Einfluß auf die Elution von Molekülen mit ionisierbaren Gruppen von der Säule.

Das Verhalten einer gelösten Substanz auf der Säule wird durch den K_d-Wert charakterisiert, der als der Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen dem inneren wäßrigen Volumen des Gels, V_i, und der wäßrigen Phase außerhalb des Gels, V_a, definiert wird [113]. Der K_d-Wert ist daher durch folgende Gleichung gegeben

$$K_d = \frac{V_e - V_a}{V_i}$$

wobei V_e das Elutionsvolumen der Verbindung (vom Aufbringen der Substanz auf die Säule bis zu ihrer maximalen Konzentration im Eluat) darstellt. K_d ist gleich Null, wenn die Substanz vollkommen vom Gel ausgeschlossen wird. Bei einem K_d-Wert von Null bis 1 kann die Substanz die Gelkörner teilweise durchdringen. Ist das gesamte innere Volumen zugänglich, so gilt $K_d = 1$. Bei einer Adsorption der Substanz an das Dextran-Gel wird der K_d-Wert größer als 1.

Die Verläßlichkeit des K_d-Wertes hängt von der Genauigkeit der Bestimmung des inneren Volumens ab. Eine sehr ungenaue Methode ist die Berechnung aus dem Wasseraufnahmevermögen des trockenen Gels ($V_i = a \times W$, wobei a das Trockengewicht des Gels und W die Wasseraufnahme in g/g darstellt) [114]. Ein kleines Molekül, das frei im Gel diffundieren kann, sollte einen K_d-Wert von 1 haben und daher eine Bestimmung des inneren Volumens ermöglichen. Jedoch ist ein Teil des inneren Volumens Hydratationswasser, das fest an das Polysaccharid-Gerüst gebunden und den gelösten Molekülen nicht zugänglich ist. Bei Sephadex G-10 zeigt daher ein K_d-Wert von etwa 0,75 eine unbeschränkte Diffusion im Gel an [112,113]. Hinzu kommt, daß die Bestimmung des inneren Volumens durch Elektrolyte (z.B. NaCl oder HCl [115,116]) ungenaue Werte ergeben kann, da sie durch die Carboxylgruppen des Gels eine Anziehung bzw. Abstoßung erfahren. Aceton kann wegen seiner geringen Adsorption nicht verwendet werden [114,117]. Die Bestimmung mit Tritium-Wasser ist dagegen mit den genannten Fehlermöglichkeiten nicht behaftet. Jedoch muß hier ein Tritiumaustausch mit den Hydroxylwasserstoffatomen der Glucose und der vernetzenden Glycerylbrücken erwartet

werden, der die K_d-Werte erniedrigt. Für G-25 wurde ein Korrekturfaktor von 1,06 berechnet und gefunden [118]. Da bei dem stärker vernetzten G-10 die notwendige Korrektur jedoch kleiner sein dürfte, wurden alle K_d-Werte in dieser Arbeit unkorrigiert angegeben.

Schon von verschiedenen Autoren [119-124] wurden Versuche unternommen, die Purin- und Pyrimidinbasen der Nucleinsäuren durch Gelchromatographie zu trennen. In allen Fällen wurden nicht flüchtige, alkalische oder neutrale Puffer zur Elution benutzt. Da im Anschluß an die Gelchromatographie jedoch die spektroskopische Analyse der gefundenen Pyrimidinderivate einsetzen sollte, wurden die K_d-Werte des Pyrimidinteils sowie seiner 5-Methoxymethyl- und 5-Aminomethylderivate für drei flüchtige Elektrolytlösungen (0,5 M Essigsäure, 0,5 M Ameisensäure und 0,1 M Ammoniak) als Elutionsmittel bestimmt (siehe Tab. 6). Wurde A. bidest. zur Elution verwendet, erschien vom aufgetragenen 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin (0,5 mg) nur ein verschwindend kleiner Teil im Eluat und auch dieser erst nach mehrtägiger Elution.

Tabelle 6

Elutionsvolumina (V_e) und Verteilungskoeffizienten (K_d-Werte) von 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin, sowie den 5-Methoxymethyl- und 5-Aminomethylanalogen an Sephadex G-10 mit 0,1 M Ammoniak, 0,5 M Ameisensäure bzw. 0,5 M Essigsäure als Elutionsmittel.

Substanz	V_e (in Fraktionen)	K_d
0,1 M Ammoniak (1 Fraktion = 6 Tropfen)		
HTO	163	
NaCl	143	0,74
Dextranblau 2000	87	
P-CH_2-OH	242	2,04
P-CH_2-OCH_3	221	1,76
P-CH_2-NH_2	242	2,04
0,5 M Ameisensäure (1 Fraktion = 2 Tropfen)		
HTO	537	
NaCl	450	0,63
Dextranblau 2000	300	
P-CH_2-OH	408	0,46
P-CH_2-OCH_3	389	0,38
P-CH_2-NH_2	332	0,14
0,5 M Essigsäure (1 Fraktion = 2 Tropfen)		
HTO	612	
NaCl	537	0,71
Dextranblau 2000	352	
P-CH_2-OH	460	0,43
P-CH_2-OCH_3	469	0,46
P-CH_2-NH_2	431	0,33

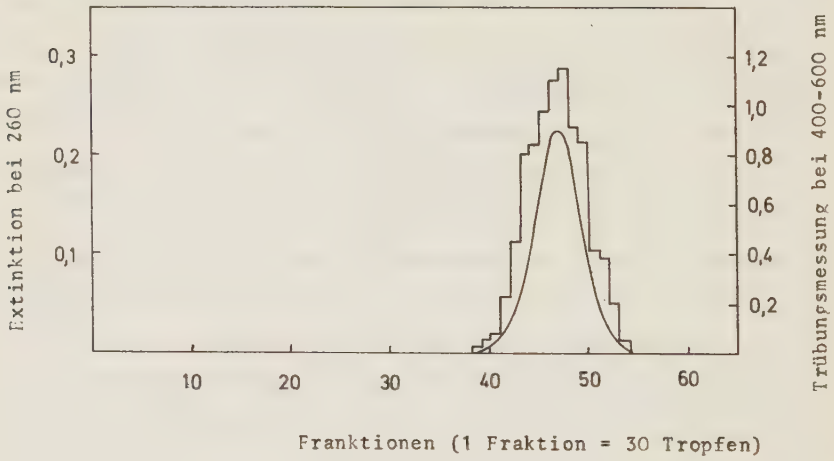
Daß mit A. bidest. als Elutionsmittel erst nach Tagen ein verschwindend geringer Teil des aufgetragenen Pyrimidins im Eluat erscheint, beruht sicherlich darauf, daß die basische Substanz

von den Carboxylgruppen des Gels festgehalten wird. Bei den sauren Elutionsmitteln 0,5 M Ameisensäure bzw. Essigsäure überwiegt der ionische Ausschluß der bei diesem pH vorliegenden Pyridiniumionen vom Gelinneren, und man beobachtet K_d-Werte um 0,4. Erst bei Überführung der Pyrimidine in die freien Basen mit 0,1 M Ammoniak als Elutionsmittel tritt die Adsorption deutlich in Erscheinung. Aus diesem Grunde wurde das letztere System zur weiteren Reinigung der aus dem Akkumulationsmedium isolierten Pyrimidine herangezogen. Da das Hydratationswasser für Natriumchlorid nicht zugänglich ist, beträgt der K_d-Wert für NaCl etwa 0,7.

Die durch Verteilungschromatographie gereinigte Verbindung II zeigt bei der Elution von einer Sephadex G-10-Säule einen symmetrischen Peak, der mit der biologischen Aktivität zusammenfällt. Die gereinigten Verbindungen I und III mußten wiederum blind chromatographiert werden. Für Substanz I wurde die biologische Aktivität in den Fraktionen 42 bis 46 gefunden (1 Fraktion = 30 Tropfen), für Verbindung III in den Fraktionen 45 bis 50.

Abb. 5

Gelchromatographie der Verbindung II an Sephadex G-10 (1,0 x 109 cm) mit 0,1 M Ammoniak. Nephelometrische Bestimmung der biologischen Aktivität mit der Pyrimidinmutante HK 210 von S. cerevisiae.



d. Spektroskopische Analyse.

Im Anschluß an die Gelchromatographie an Sephadex G-10 wurden die drei Pyrimidinderivate I, II und III UV- und IR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch untersucht, um weitere Anhaltspunkte für ihre Struktur zu gewinnen.

Alle drei Pyrimidine haben das gleiche UV-Spektrum:

in 0,1 N HCl λ_{max} = 246 nm,

in 0,1 N NaOH λ_{max} bei 234 und 272 nm.

Nur Substanz II lag in so großer Menge vor, daß ein hoch aufgelöstes Massenspektrum aufgenommen werden konnte. Von dem niedrig aufgelösten Spektrum (siehe Abb. 6) wurden acht Peaks ausgewählt, um ihre genaue Masse zu bestimmen (siehe Tab. 7). An Hand dieser Daten wurde versucht, ein Fragmentierungsschema aufzubauen (siehe Abb. 7).

Tabelle 7

Gemessene und berechnete Massen von acht Peaks aus dem Massenspektrum der Pyrimidinverbindung II.

gemessene Masse	berechnete Masse	Zusammensetzung
139,0739	139,0746	$C_6H_9N_3O$
122,0715	122,0718	$C_6H_8N_3$
110,0718	110,0718	$C_5H_8N_3$
81,0454	81,0453	$C_4H_5N_2$
70,0531	70,0531	$C_3H_6N_2$
69,0453	69,0453	$C_3H_5N_2$
53,0265	53,0265	C_3H_3N
52,0189	52,0187	C_3H_2N

Abb. 6

Massenspektrum des Pyrimidinderivates II. Alle Peaks, die kleiner als 3% waren, wurden vernachlässigt. Ionisierungsenergie 70 eV.

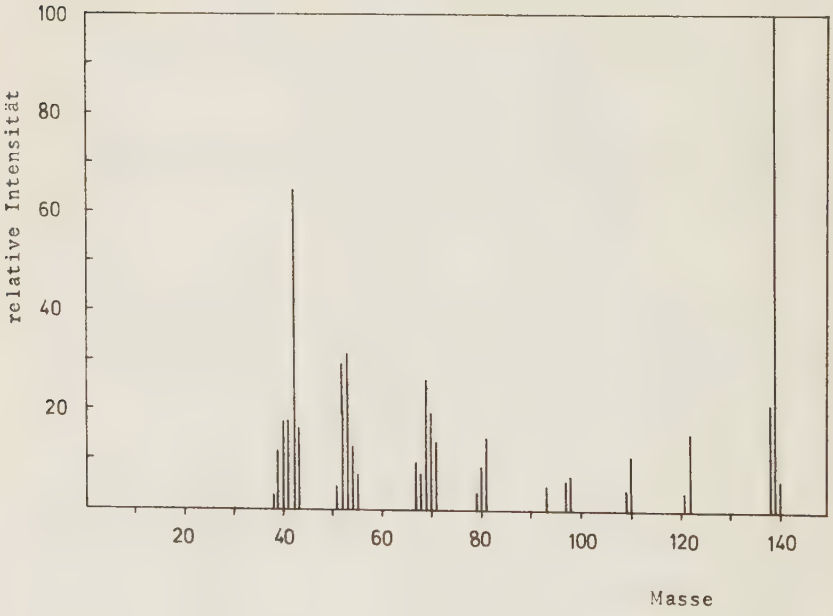
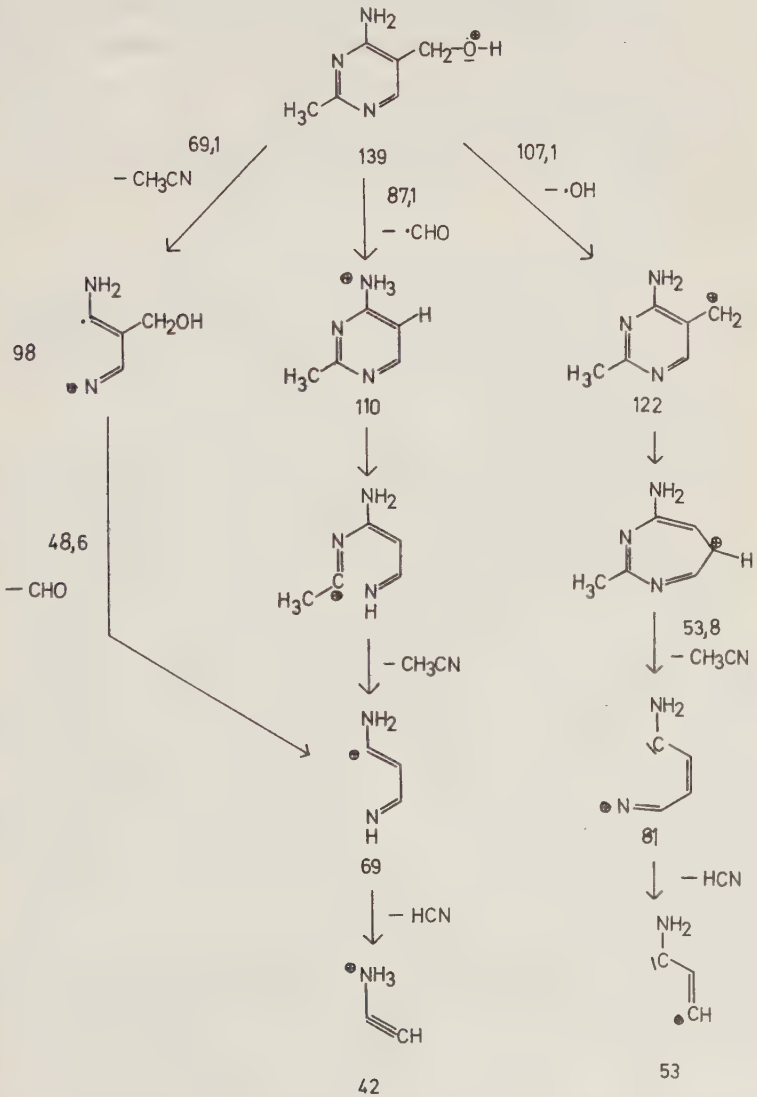


Abb. 7

Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema von 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin unter Elektronenbeschuß.



Das Molekülion (m/e 139) kann auf drei Arten fragmentieren. Der Verlust eines Formylradikals, $\cdot CHO$, gesichert durch das Auftreten eines metastabilen Peaks bei m/e 87 (87,1 berechnet für $139 \rightarrow 110$), führt zu dem Ion m/e 110. Dieses spaltet unter Bildung des Ions m/e 69 Acetonitril, CH_3CN, ab. Wenn hierbei die Ringspaltung zwischen N_1 und C_2 erfolgt, kann anschließend HCN abgespalten werden. Bei einer Spaltung zwischen C_2 und N_3 wäre dies nicht möglich. Daher wird wahrscheinlich der erste Weg beschritten.

Ferner kann das Molekülion durch den Verlust eines Hydroxylradikals, $\cdot OH$, und Ringerweiterung in das Ion m/e 122 übergehen (schwach ausgeprägter metastabiler Peak bei m/e 107; 107,1 berechnet für $139 \rightarrow 122$).
Bei der folgenden Abspaltung von Acetonitril, CH_3CN, die durch das Auftreten eines metastabilen Peaks bei m/e 54 (53,8 berechnet für $122 \rightarrow 81$) gesichert ist, entsteht das Ion m/e 81. Dieses geht anschließend durch HCN-Abspaltung in das Ion m/e 53 über.

Das Molekülion kann aber auch direkt Acetonitril abspalten. Hierbei tritt ein metastabiler Peak bei m/e 69 auf (69,1 berechnet für $139 \rightarrow 98$). Der anschließende Verlust eines Formylradikals führt zu dem schon erwähnten Ion m/e 69 (metastabiler Peak bei m/e 48,5; 48,6 berechnet für $98 \rightarrow 69$). Danach dürfte wieder HCN abgespalten werden.

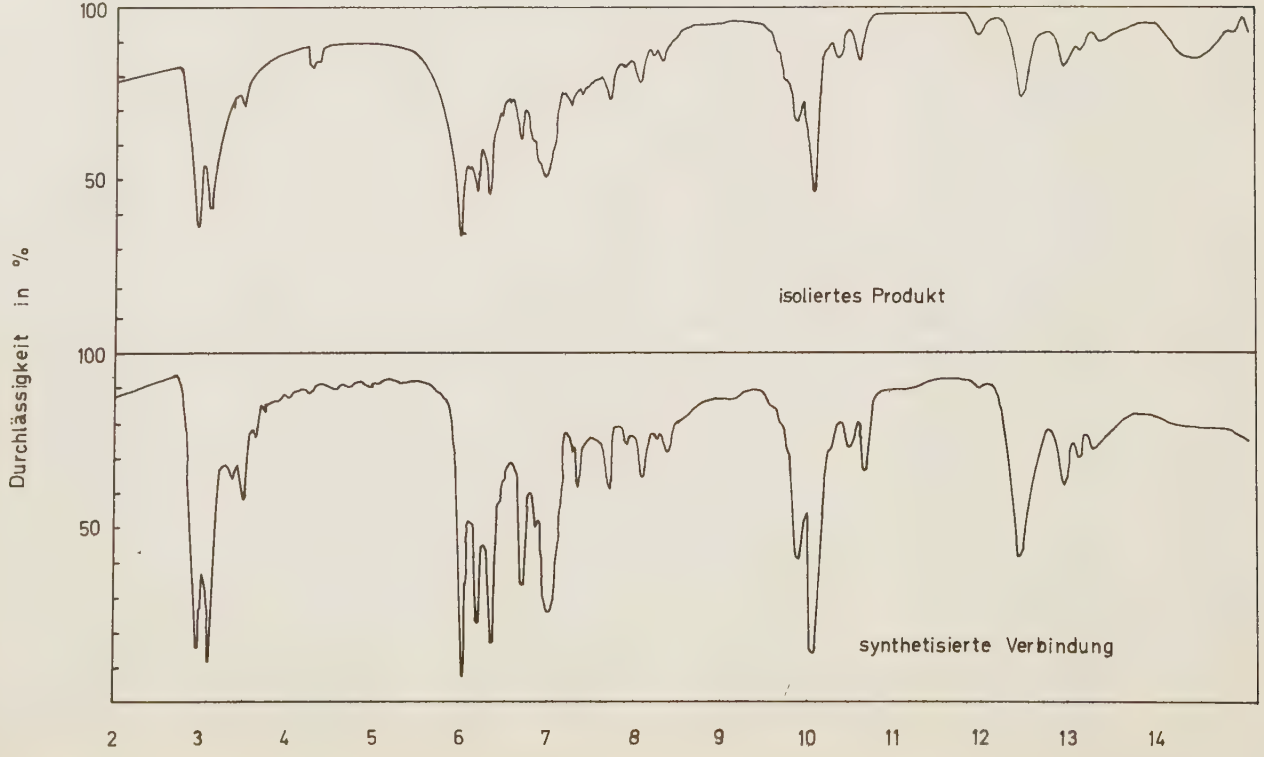
Von den Pyrimidinverbindungen I und III konnte aus Substanzmangel nur ein einfaches Massenspektrum gewonnen werden. Bei den Spektren

beider Substanzen stellte das Molekülion den höchsten Peak dar (m/e 153 bzw. m/e 175).

Die Abbildung 8 zeigt ein IR-Spektrum der Substanz II und des 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidins. Die Übereinstimmung ist recht gut.

Abb. 8

IR-Spektrum einer authentischen Probe 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin und des isolierten Produktes aus dem Akkumulationsmedium der Thiazolmutante L 218 von E. coli. KBr-Pressling.



Vergleichende Papierchromatographie in drei Systemen, vergleichende Säulenchromatographie (Ionenaustausch-, Verteilungs- und Gelchromatographie) und Massenspektrometrie zeigen also, daß es sich bei Verbindung I um das 2-Methyl-4-amino-5-methoxymethyl-pyrimidin, bei der Verbindung II um das 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin und bei Verbindung III um das 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidin handelt. Die Identität der Substanz II wurde ferner durch IR-Spektrometrie und ein hoch aufgelöstes Massenspektrum gesichert.

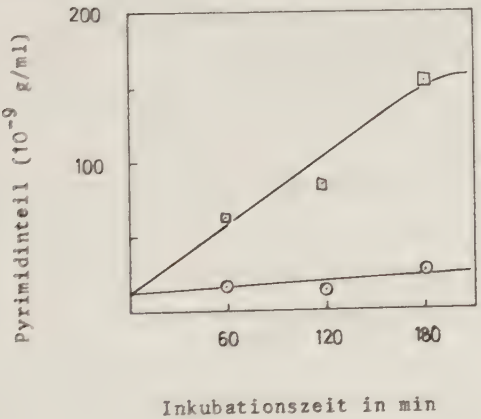
4. Zur Regulation der Biosynthese des Pyrimidinteils.

Schon bevor man wußte, daß die Biosynthese des Pyrimidinteils von der der Purine abzweigt, war bekannt, daß sie bei Aerobacter aerogenes [93] und Salmonella typhimurium [73] durch Adenosin gehemmt werden kann. Jedoch wird diese Hemmung erst durch den engen biogenetischen Zusammenhang zwischen den Purinen und dem Thiamin verständlich. Newell und Tucker [74] benutzten die Derepression der Pyrimidinbiosynthese im Anschluß an eine Adenosinhemmung, um die Regulation der Thiaminbiosynthese bei Salmonella typhimurium aufzuklären. Daß die Biosynthese des Pyrimidinteils durch Thiamin reprimiert wird, ist ein Teil ihrer Ergebnisse. Analoge Untersuchungen bei E. coli führen zu demselben Resultat.

Während der Präinkubation mit Adenosin kann kein Hydroxymethylpyrimidin gebildet werden, und die Zelle verarmt an Thiamin. Wird das Adenosin anschließend durch Waschen entfernt, setzt eine gesteigerte Synthese des Pyrimidinteils ein (siehe Abb. 9). Trotzdem können die Zellen nicht wachsen, da ihnen der Thiazolteil zur Thiaminsynthese fehlt. Durch den Thiaminmangel wird also die Biosynthese des Pyrimidinteils dereprimiert. Wird in Gegenwart von Thiamin präinkubiert, tritt keine Verarmung an Thiamin in der Zelle ein. Folglich wird auch die Pyrimidinbiosynthese nicht dereprimiert.

Abb. 9

Synthese des Pyrimidinteils durch eine nicht wachsende, gewaschene Zellsuspension der E. coli-Mutante L 218, die 2,5 h in Minimalmedium mit folgenden Zusätzen präinkubiert war: ⊡ 300 mg Adenosin /l, ○ 300 mg Adenosin/l und 0,02 mg Thiaminhydrochlorid/l.



5. Enzymatische Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der gefundenen Pyrimidinderivate.

Aufgrund vieler Arbeiten kann es als gesichert angesehen werden, daß das 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin ein Intermediärprodukt der Thiaminbiosynthese darstellt. Neben dem Pyrimidinteil wurden jedoch im Akkumulationsmedium der Thiazolmutante L 218 auch das 5-Methoxymethyl- und das 5-Aminomethylderivat gefunden. Ob es sich bei diesen Verbindungen um Nebenprodukte oder obligatorische Zwischenprodukte handelt, ist bislang unbekannt. Diorio und Lewin [72] konnten bei Neurospora crassa neben den eben genannten Pyrimidinen noch das 5-Formylderivat im Akkumulationsmedium einer Thiazol- und einer Thiaminmangelmutante finden. Sie stellen die Hypothese auf, daß das 5-Formyl- und das 5-Aminomethylderivat echte Zwischenprodukte darstellen, das 5-Methoxymethylderivat jedoch ein Nebenprodukt.

Da Thiamin die Biosynthese des Pyrimidinteils reprimiert, sollten auch die Enzyme für die Umwandlung des 5-Aminomethyl- und 5-Methoxymethylderivates in den Pyrimidinteil durch Thiamin in ihrer Synthese gehemmt werden, sofern die fraglichen Pyrimidinverbindungen echte Zwischenprodukte sind. Sowohl Thiazol- wie Pyrimidin-Mangelmutanten wurden in Minimalmedium mit limitierenden Mengen des Thiazol- bzw. des Pyrimidinteils angezüchtet. Im Repressionsversuch wurde dem Minimalmedium ein Überschuß an Thiamin zugesetzt. Der Rohextrakt wurde dialysiert, um eventuell in der Zelle vorhandenes Thiamin zu entfernen, das die zu untersuchenden Enzyme hemmen könnte. Folgende Tabellen (Tab. 8a und b) geben die gefundenen Enzymaktivitäten in 10^{-6} M Produkt/mg Protein/min bei 37°C für die verschiedenen Mutanten und Organismen unter Repressions- bzw. Derepressionsbedingungen wieder.

Tab. 8a

Enzymaktivitäten (in 10^{-9} M gebildetem 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin/mg Protein/min bei 37°C) der Reaktion Pyr-CH_2NH_2 → Pyr-CH_2OH im dialysierten Rohextrakt von unter Repressions- bzw. Derepressionsbedingungen gewachsenen Zellen.

Organismus, Mutante	Enzymaktivität		
	Derepression	Repression (Minimalmedium mit 0,1 mg Thiamin/1)	Repression (Komplettmedium)
E. coli L 218	172, 154, 172	148, 169, 155	151
E. coli R 4685	189, 206, 192	190, 209, 196	187
S. cerevisiae HK 302	120	108	-
S. cerevisiae HK 210	97	102	-

Tab. 8b

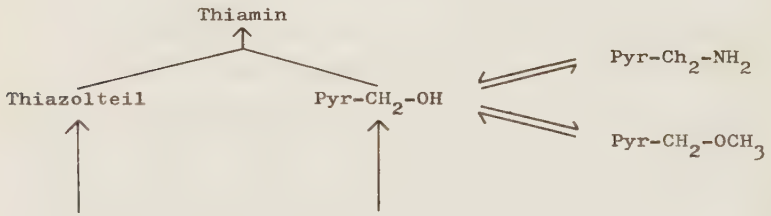
Enzymaktivitäten der Reaktion Pyr-CH_2OCH_3 → Pyr-CH_2OH unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in Tabelle 8a.

Organismus, Mutante	Enzymaktivität		
	Derepression	Repression (Minimalmedium mit 0,1 mg Thiamin/1)	Repression (Komplettmedium)
E. coli L 218	81, 94, 79	61, 74, 82	61
E. coli R 4685	46, 39, 71	63, 40, 51	50
S. cerevisiae HK 302	49	41	-
S. cerevisiae HK 210	40	47	-

Aus den Tabellen 8a und b ist deutlich zu ersehen, daß Thiamin die Aktivität beider Enzyme im Rohextrakt nicht signifikant vermindert. Dies spricht dafür, daß zumindest bei E. coli beide Substrate, das 5-Aminomethyl- und 5-Methoxymethyl-pyrimidin, keine echten Zwischenprodukte in der Biosynthesekette des Pyrimidinteils sind (siehe Abb. 10). Ob dies auch für S. cerevisiae zutrifft, kann nicht beurteilt werden, da die Reprimierbarkeit der Biosynthese des Pyrimidinteils bei diesem Organismus nicht untersucht wurde.

Abb. 10

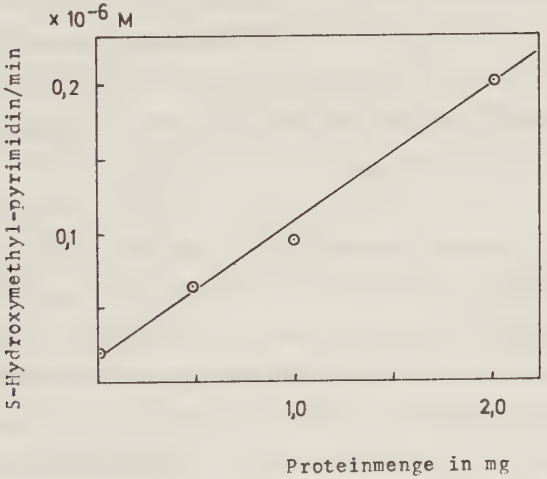
Beziehung des 5-Aminomethyl- und des 5-Methoxymethyl-pyrimidins zur Biosynthese des Thiamins.

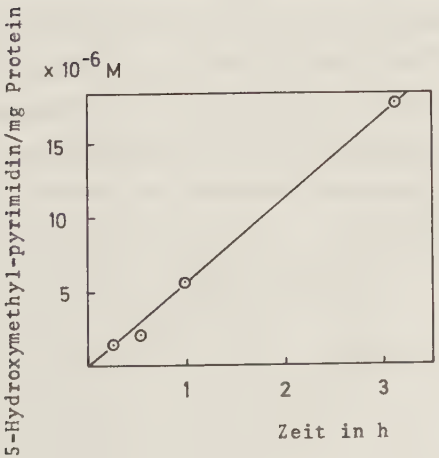


Die Abbildungen 11 a und b zeigen die Abhängigkeit der Umwandlung des 5-Aminomethylderivates in das 5-Hydroxymethyl-pyrimidin von der Inkubationszeit und der eingesetzten Proteinmenge.

Abb. 11 a und b

Abhängigkeit der Bildung von 5-Hydroxymethyl-pyrimidin aus dem 5-Aminomethylderivat von der Inkubationszeit (a) und der Proteinmenge (b) bei 37°C. Aufarbeitung des Inkubationsansatzes wie unter "Methoden" beschrieben.





Diorio und Lewin [44] untersuchten die Umwandlung des 5-Methoxymethyl- und des 5-Aminomethylderivates in die 5-Hydroxymethylverbindung mit ganzen Zellen. Eine Verminderung der Aktivität durch Thiamin konnten sie nicht beobachten. Sie ziehen jedoch aus diesem Ergebnis keine Folgerungen und postulieren, daß das 4-Aminomethylderivat ein Vorläufer des Pyrimidinteils ist (siehe Abschnitt "Biosynthese des Pyrimidinteils"). Camiener und Brown gelang es, durch eine 3-stündige Inkubation bei 37°C mit einem Rohextrakt aus einer käuflichen Bäckerhefe die 5-Aminomethyl- und 5-Methoxy-methyl-pyrimidine quantitativ in das 5-Hydroxymethylderivat umzuwandeln.

Falls das 5-Aminomethylderivat ein Zwischenprodukt der Biosynthese des Pyrimidinteils darstellt, sollte es auch Mutanten geben, die den betreffenden enzymatischen Schritt nicht mehr durchführen können. Solche Mutanten konnte ich jedoch nicht finden. Die einzige in der Literatur beschriebene Mutante, die das 5-Aminomethyl-pyrimidin nicht zur Thiaminbiosynthese verwenden kann, die Mutante ATh4 von Salmonella typhimurium [17], ist wahrscheinlich in einem der Schritte zur Synthese des 4-Aminoimidazol-ribonucleotids blockiert, da sie auch ein Purin zum Wachstum benötigt. Weil sie außerdem das 5-Methoxymethylderivat nicht in die Thiaminbiosynthese einzuschleusen vermag, kann man vermuten, daß eine oder mehrere unspezifische enzymatische Reaktionen blockiert sind.

6. Isolierung des 4-Amino-imidazol-ribonucleotids.

Die klassischen Arbeiten von Buchanan und Greenberg haben gezeigt, daß das 4-Amino-imidazol-ribonucleotid ein Intermediärprodukt der Purinbiosynthese ist. Die Gewinnung des Ribotids scheint auf drei Wegen möglich zu sein.

(1) Darstellung aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, Glycin, Glutamin, Formiat und ATP mittels eines gereinigten Enzymextrakts [106].

(2) Isolierung des Ribosids aus dem Akkumulationsmedium geeigneter Mutanten [125,126] und seine anschließende Phosphorylierung durch einen gereinigten Enzymextrakt mit Hilfe von ATP [127,128] (siehe auch [129]).

(3) Vermutlich wird das Imidazolderivat in den Zellen einer entsprechend blockierten Mutante als Ribotid akkumuliert und erst beim Durchtritt durch die Zellwand dephosphoryliert. Die erfolgreichen Untersuchungen [130] mit Mutanten in der Histidinbiosynthese, die auf ganz analogen Überlegungen aufbauen, haben den Anstoß dazu gegeben, daß diese relativ einfache Möglichkeit für die Darstellung des Ribotids experimentell geprüft wurde.

Zur Reinigung des Ribotids durch Gelchromatographie wurde Sephadex G-15 verwendet, da aus einer vergleichenden Untersuchung [114] der verschiedenen Sephadex-Typen bekannt ist, daß organisch gebundene Phosphate von Sephadex G-10 weitgehend ausgeschlossen werden, aber schon recht gut in G-15 eindringen können. Die Abbildung 12 gibt ein typisches Elutionsdiagramm eines proteinfreien Zellextraktes der Mutante 0135 wieder. Deutlich ist das Auftreten von zwei

Bratton-Marshall-positiven Verbindungen zu erkennen. Bei Peak 2 handelt es sich um das 4-Amino-imidazol-ribonucleotid. Sein in der Bratton-Marshall-Reaktion entstehender Chromophor hat ein Maximum bei 247 bis 248 nm (siehe Abb. 13). In dem breiten Peak 1 wird eine braungefärbte Substanz eluiert. Der Chromophor der durch Diazotierung und Kupplung dieser Verbindung entsteht, hat ein Maximum bei 507 bis 508 nm.

Die Bestimmung des organisch gebundenen Phosphats ergab, daß auf 1 Mol Ribotid 0,88 Mol Phosphat kommen.

Abb. 12

Elutionsdiagramm eines proteinfreien Zellextraktes der Mutante 0135 von E. coli, die unter limitierenden Mengen Hypoxanthin (14 mg/l) und Thiamin (0,005 mg/l) gezüchtet und anschließend 3 h in Minimalmedium mit 2 % Glucose und je 1 mM/l Glycin, Natriumformiat und Glutamin geschüttelt worden war.

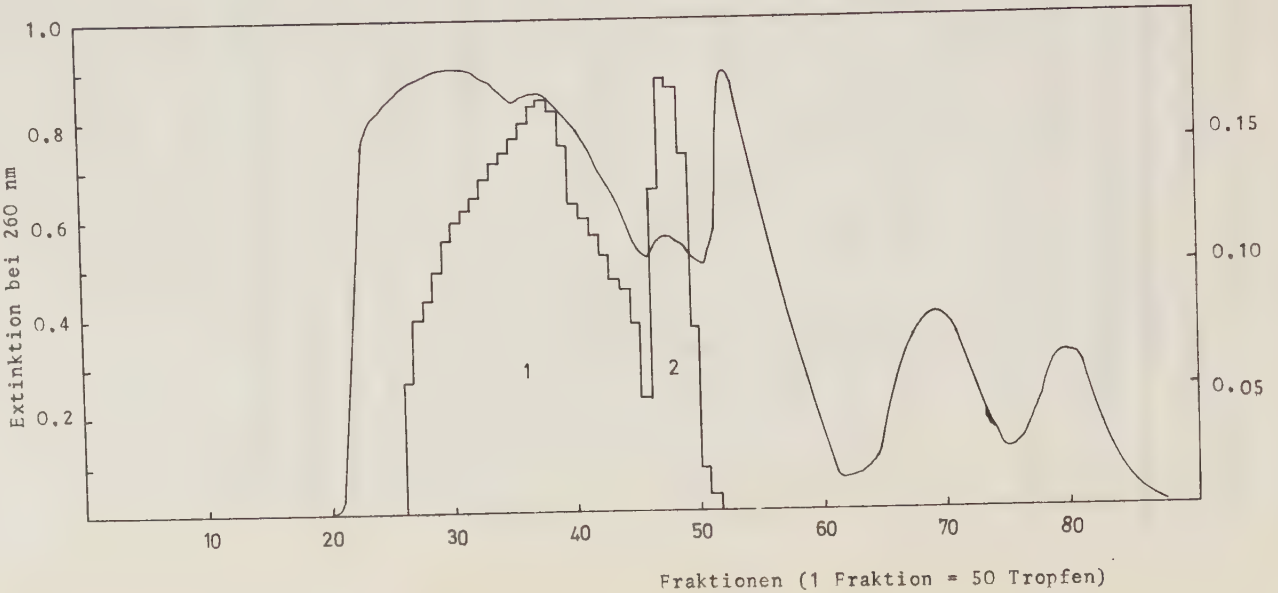
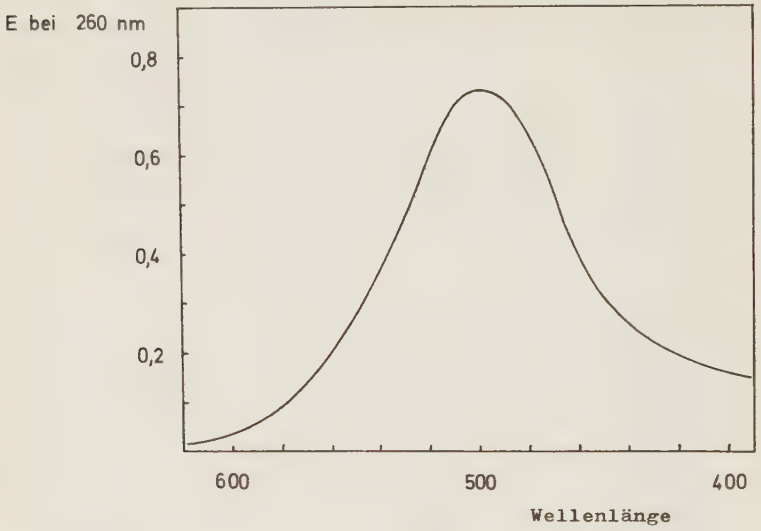


Abb. 13

Absorptionsspektrum des Chromophors, der durch Diazotierung und Kupplung in der Bratton-Marshall-Reaktion aus dem 4-Amino-imidazol-ribonucleotid gebildet wird.



7. Enzymatische Umwandlung des 4-Amino-imidazol-ribonucleotids in den Pyrimidinteil.

Es konnte gezeigt werden, daß ein roher, nicht dialysierter, zellfreier Enzymextrakt der Thiazolmutante L 218 von E. coli die Fähigkeit besitzt, das 4-Amino-imidazol-ribonucleotid in den Pyrimidinteil umzuwandeln. Dem Inkubationsansatz wurde L-Methionin zugesetzt, da verschiedene Hinweise [44,65] dafür vorliegen, daß diese Aminosäure für die Biosynthese des Pyrimidinteils benötigt wird. Die Zellen wurden in Gegenwart von limitierenden Mengen Thiaminhydrochlorid (0,005 mg/l) und einem großen Überschuß an

Adenosin (300 mg/l) angezüchtet, um die Enzyme der Biosynthese des Pyrimidinteils zu dereprimieren und die der Purinbiosynthese zu reprimieren. Dadurch sollte eine fast ausschließliche Umwandlung des eingesetzten Ribotids in den Pyrimidinteil erreicht werden. Die gefundene Enzymaktivität beträgt 1,4 x 10^{-9} M gebildetes 5-Hydroxymethyl-pyrimidin/mg Protein/min bei 37°C (Mittelwert aus drei Versuchen) (siehe Tab. 9).

Der Enzymextrakt aus einer einzigen der beiden Mutanten HK 210 und HK 354 von S. cerevisiae vermag das Ribotid nicht in den Pyrimidinteil umzuwandeln. Gibt man jedoch Rohextrakt aus beiden zugleich in einen Inkubationsansatz, kommt es wieder zur Bildung des 5-Hydroxymethyl-pyrimidins (Mittelwert der Enzymaktivität = 0,6 x 10^{-9} M/mg Protein/min). In einem separaten Versuch wurde zuerst der Extrakt der Mutante HK 210 (P1-Mutante) zugegeben und 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 3 min bei 100°C erhitzt und das ausgefallene Protein bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Dann wurde der Extrakt der Mutante HK 354 (P2-Mutante) zugesetzt und erneut 3 h inkubiert. Anschließend beobachtet man eine geringe Bildung des Pyrimidinteils (Mittelwert der Enzymaktivität = 0,3 x 10^{-9} M/mg Protein/min). Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß der Enzymextrakt von HK 210 das Ribotid in eine unbekannte Verbindung X umwandelt, die zur anschließenden Bildung des 5-Hydroxymethyl-pyrimidins als Substrat gebraucht wird.

Tabelle 9

Enzymatische Umsetzung des 4-Amino-imidazol-ribonucleotids in das 5-Hydroxymethyl-pyrimidin durch Enzymrohextrakte verschiedener Herkunft. Aktivität in 10^{-9} M 5-Hydroxymethyl-pyrimidin/mg Protein/min bei 37°C. Bei der gleichzeitigen Zugabe der Extrakte aus den Mutanten HK 210 und HK 354 von S. cerevisiae wurde die Proteinmenge aus beiden Extrakten zur Aktivitätsbestimmung herangezogen. Bei aufeinanderfolgender Zugabe wurde nur die Proteinmenge aus dem zweiten Extrakt und dessen Inkubationszeit für die Aktivitätsbestimmung verwendet.

Enzymextrakt aus der Mutante	Aktivität
E. coli L 218	1.8, 2.0, 0.5
S. cerevisiae HK 354	unter 0,05
S. cerevisiae HK 210	unter 0,05
S. cerevisiae HK 354 + HK 210	
(a) gleichzeitig zugesetzt	1.3, 0.2, 0.3
(b) 3 h Inkubation mit Extrakt aus HK 210, 3 min Erhitzen auf 100°C, Inkubation mit HK 354.	0.5, 0.09, 0.2

8. Untersuchungen zum Akkumulationsprodukt der P2-Mutante HK 210 von S. cerevisiae.

Die wachstumsaktive Verbindung im Akkumulat der P2-Mutante HK 210 von S. cerevisiae wurde von der Kohle gut und schnell adsorbiert. Der Durchlauf besaß keine nennenswerte Wachstumswirksamkeit mehr. Die Desorption erfolgte fast quantitativ mit dem Äthanol/Wasser-

(1:1)-Gemisch, während die Hauptmenge der adsorbierten Verbindungen erst mit dem Gemisch Äthanol/konz. Ammoniak/Wasser (25:15:65) eluiert werden konnte. Bei der Gelchromatographie an Sephadex G-10 mit 0,5 M Ammoniak wurde fast die gesamte Wachstumsaktivität mit der Fraktion 26 eluiert. Dies entspricht einem K_d-Wert von 0,60. Durch anschließende Gelchromatographie an Sephadex G-10 mit 0,5 M Essigsäure konnte die wachstumsaktive Substanz weiter gereinigt werden. In diesem System hat sie einen K_d-Wert von 0,57.

Das Elutionsverhalten der wachstumsaktiven Verbindung auf der G-10-Säule im sauren (0,5 M Essigsäure) und alkalischen (0,5 M Ammoniak) Milieu entspricht keineswegs dem eines in 2- und 5-Stellung substituierten 4-Amino-pyrimidins. Die UV-Spektren der eluierten wachstumsaktiven Fraktionen geben außerdem keinen Hinweis darauf, daß die unbekannte Verbindung X einen Pyrimidinring enthält.

Es darf wohl als gesichert angenommen werden, daß die gereinigte, von HK 210 akkumulierte Verbindung identisch ist mit der unbekannten Verbindung, die im Kreuzfütterungstest von den P2-Mutanten abgegeben wird und die P1-Mutanten füttert. Ferner muß sie identisch mit der Verbindung sein, die vom Enzymextrakt der Mutante HK 210 aus 4-Amino-imidazolribonucleotid gebildet wird und anschließend durch Enzyme der Mutante HK 354 in den Pyrimidinteil umgewandelt werden kann.

E. Zusammenfassung.

Die zur Verfügung stehenden Mutanten von S. cerevisiae und E. coli konnten in drei Gruppen eingeteilt werden, je nachdem ob sie den Pyrimidinteil (2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin), den Thiazolteil (4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)-thiazol) oder beide Bausteine zur Thiaminbiosynthese benötigen.

Fünf Analoga des Pyrimidinteils wurden geprüft, ob sie diesen in Wachstumsversuchen mit Pyrimidinteil-Mangelmutanten verschiedener Mikroorganismen ersetzen können. Die in 5-Stellung veränderten Analoga 5-Aminomethyl-, 5-Chloromethyl-, 5-Methoxymethyl- und 5-Äthoxymethyl-pyrimidin besitzen Wachstumswirksamkeit. Wird die 4-Aminogruppe des Pyrimidinteils durch eine Hydroxygruppe ersetzt, zeigt das entstehende 2-Methyl-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-pyrimidin keine Fütterungswirksamkeit.

Durch Kreuzfütterungsversuche konnten die Pyrimidinteil-Mutanten in zwei Gruppen (P1- und P2-Mutanten) eingeteilt werden. Bei den Thiazolmutanten fielen entsprechende Versuche negativ aus.

Im Akkumulationsmedium von Thiazolmutanten von S. cerevisiae und einer Mutante desselben Organismus, die den Thiazol- und Pyrimidinteil zum Wachstum benötigt, fanden sich Adenosin und Thiaminpyrophosphat.

Die Thiazolmutante L 218 von E. coli gibt unter Mangelbedingungen drei Pyrimidinderivate ans Medium ab: 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin und seine 5-Aminomethyl- und 5-Methoxy-

methylderivate. Die Isolierung gelang durch Adsorption an Aktivkohle, Ionenaustausch, Verteilungs- und Gelchromatographie. Die Identifizierung erfolgte durch vergleichende Papier- und Säulenchromatographie und Massenspektrometrie, im Fall des 5-Hydroxymethylderivates auch durch IR-Spektroskopie.

An Hand eines hoch aufgelösten Massenspektrums wird ein Schema für die Fraktionierung des 5-Hydroxymethylpyrimidins unter Elektronenbeschuß vorgeschlagen.

Die Biosynthese des Pyrimidinteils unterliegt bei E. coli der Kontrolle des Thiamins durch Repression, wie Versuche zur Akkumulation des Pyrimidinteils durch dereprimierte und reprimierte Zellen einer Thiazolmangelmutante zeigten.

Die Enzyme für die Umwandlung des 5-Aminomethyl- und 5-Methoxymethyl-pyrimidins in den Pyrimidinteil können durch Thiamin nicht reprimiert werden. Es wird angenommen, daß sie nicht direkt an der Biosynthese des Pyrimidinteils beteiligt sind, und daß die 5-Aminomethyl- und 5-Methoxymethylderivate Nebenprodukte darstellen.

Aus dem Zellinneren einer Purinmangelmutante ließ sich das 4-Amino-imidazol-ribonucleotid freisetzen und durch Gelchromatographie in gereinigter Form darstellen.

Ein zellfreier, nicht dialysierter Enzymextrakt einer Thiazolmutante von E. coli kann in Gegenwart von L-Methionin das 4-Amino-

imidazol-ribonucleotid in den Pyrimidinteil umwandeln. Extrakte aus den Pyrimidinteil-Mutanten HK 354 (P1-Mutante) oder HK 210 (P2-Mutante) besitzen diese Fähigkeit nicht, wohl aber eine Kombination beider Extrakte. Wird zuerst mit dem Extrakt aus HK 210 inkubiert, kurz erhitzt und anschließend mit einem Extrakt aus HK 354 inkubiert, beobachtet man ebenfalls eine Synthese des 5-Hydroxymethyl-pyrimidins. Daraus wird auf die intermediäre Bildung einer unbekannten Verbindung in der Biosynthese des Pyrimidinteils geschlossen.

Aus dem Akkumulationsmedium der P2-Mutante HK 210 konnte durch Adsorptions- und Gelchromatographie eine Verbindung angereichert werden, die für die P1-Mutante HK 354 Wachstumsaktivität besitzt. Das chromatographische Verhalten der Substanz auf der G-10-Säule im alkalischen und sauren Milieu und vorläufige UV-spektroskopische Untersuchungen der wachstumsaktiven Fraktionen führen zu dem Schluß, daß die Verbindung keinen Pyrimidinring enthält.

F. Literaturverzeichnis.

1. Goodwin, T.W., The Biosynthesis of Vitamins and related compounds, Academic Press, London and New York (1963)
2. Schopfer, W.H. und A. Jung, C.R. Acad. Sci., Paris 204, 1500 (1937)
3. Robbins, W.J. und F. Kawanagh, Proc. Nat. Acad. Sci. 23, 499 (1937)
4. Koser, S.A. und M.H. Wright, J. Infect. Dis. 71, 86 (1942)
5. Schopfer, W.H., Plants and Vitamins, Chronica Botanica, Waltham, Massachusetts USA (1943)
6. Lutz, A., Bull. Soc. Chim. Biol., Paris 30, 330 (1948)
7. Went, F.W., J. Bonner und G.C. Warner, Science 87, 170 (1938)
8. Robbins, W.J. und M.A. Bartley, Proc. Nat. Acad. Sci. 23, 385 (1937)
9. Bonner, J., Amer. J. Bot. 27, 692 (1940)
10. Bonner, J. und E.R. Buchman, Proc. Nat. Acad. Sci. 24, 431 (1938)
11. Bonner, J., Amer. J. Bot. 25, 543 (1938)
12. McClary, J.E., Proc. Nat. Acad. Sci. 26, 581 (1940)
13. Nobêcourt, P., C. R. Soc. Biol., Paris 133, 530 (1940)
14. Korte, F. und H. Weitkamp, Liebigs Ann. 622, 121 (1959)
15. Korte, F., H. Weitkamp und J. Vögel, Liebigs Ann. 628, 158 (1959)
16. Nakayama, H., Vitamins (Kyoto) 11, 169 (1956); C. A. 51, 18091 (1957)
17. Camiener, G.W. und G.M. Brown, J. Biol. Chem. 235, 2404 (1960)
18. Harris, D.L. und J. Yavit, Fed. Proc. 16, 192 (1957)
19. Leder, I.G., Fed. Proc. 18, 270 (1959)
20. Leder, I.G., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1, 63 (1959)
21. Nose, Y., K. Ueda und T. Kawasaki, Biochim. Biophys. Acta 34, 277 (1959)
22. Kawasaki, T., Seikagaku 32, 31 (1960)

23. Kawasaki, T., Seikagaku 32, 106 (1960)

24. Sato, T., Seikagaku 32, 822 (1960)

25. Kawasaki, T., T. Fujita, A. Iwashima, K. Ueda und Y. Nose, Koso Kagaku Shimpojumu 15, 153 (1961)

26. Nose, Y., K. Ueda und T. Kawasaki, J. Vitaminol. 7, 92 (1961)

27. Nose, Y., K. Ueda, T. Kawasaki, A. Iwashima und T. Fujita, J. Vitaminol. 7, 98 (1961)

28. Iwashima, A., Seikagaku 34, 647 (1962)

29. Tsubota, Y., Vitamins (Kyoto) 29, 510 (1964)

30. Iwashima, A., Seikagaku 36, 194 (1964); C. A. 62, 2960 (1965)

31. Lewin, L.M. und G.M. Brown, J. Biol. Chem. 236, 2768 (1961)

32. Camiener, G.W. und G.M. Brown, J. Biol. Chem. 235, 2411 (1960)

33. Leder, I.G., J. Biol. Chem. 236, 3066 (1961)

34. Shimazono, N., Y. Mano, R. Tanaka und Y. Kaziro, J. Biochem. 46, 959 (1959)

35. Lewin, L.M. und G.M. Brown, Arch. Biochem. Biophys. 101, 197 (1963)

36. Harris, D.L., Federation Proc. 11, 226 (1952)

37. Harris, D.L., Arch. Biochem. Biophys. 41, 293 (1952)

38. Harris, D.L., Arch. Biochem. Biophys. 60, 35 (1956)

39. Nakayama, H. Vitamins (Kyoto) 11, 20 (1956); C. A. 51, 18091 (1957)

40. Iwashima, A., M. Hirabayashi und Y. Tokuda, Vitamins (Kyoto) 28, 170 (1963)

41. Iwashima, A., Seikagaku 36, 147 (1964)

42. Iwashima, A. und Y. Nose, J. Biochem. 62, 537 (1967)

43. Nose, Y., Y. Tokuda, M. Hirabayashi und A. Iwashima, J. Vitaminol. 10, 105 (1964)

44. Diorio, A.F. und L.M. Lewin, J. Biol. Chem. 243, 3999 (1968)

45. Harris, D.L., Arch. Biochem. Biophys. 57, 240 (1955)

46. Eberhart, B.M. und E.L. Tatum, Arch. Biochem. Biophys. 101, 378 (1963)

47. Eberhart, B.M. und E.L. Tatum, Amer. J. Bot. 48, 702 (1961)

48. Nakayama, H., Vitamins (Kyoto) 10, 417 (1956)

49. Guthrie, R., M. Hillman und E. Hyatt, Bacteriol. Proc. 1956, 122

50. Guthrie, R., M.J. Pine und E. Hyatt, Bacteriol. Proc. 1957, 124

51. Pine, M.J. und R. Guthrie, J. Bacteriol. 78, 545 (1959)

52. David, S. und B. Estramareix, Biochim. Biophys. Acta 42, 562 (1960)

53. David, S. und B. Estramareix, Biochim. Biophys. Acta 49, 411 (1961)

54. David, S. und B. Estramareix, Bull. Soc. Chim. France 1964, 2023

55. David, S., B. Estramareix und H. Hirshfeld, Biochim. Biophys. Acta 127, 264 (1966)

56. David, S., B. Estramareix und H. Hirshfeld, Biochim. Biophys. Acta 148, 11 (1967)

57. Tomlinson, R.V., Biochim. Biophys. Acta 115, 526 (1966)

58. Tomlinson, R.V., D.P. Kuhlman, P.F. Torrence und H. Tieckelmann, Biochim. Biophys. Acta 148, 1 (1967)

59. Nakamura, M., Vitamins (Kyoto) 32, 383 (1965)

60. Johnson, D.B., D.J. Howells und T.W. Goodwin, Biochem. J. 91, 8P (1964)

61. Johnson, D.B., D.J. Howells und T.W. Goodwin, Biochem. J. 98, 30 (1966)

62. Kumaoka, H. und G.M. Brown, Arch. Biochem. Biophys. 122, 378 (1967)

63. Goldstein, G.A. und G.M. Brown, Arch. Biochem. Biophys. 103, 449 (1963)

64. Newell, P.C. und R.G. Tucker, Nature 215, 1384 (1967)

65. Newell, P.C. und R.G. Tucker, Biochem. J. 106, 271 (1968)

66. Newell, P.C. und R.G. Tucker, Biochem. J. 106, 279 (1968)

67. Brooke, M.S. und B. Magasanik, J. Bacteriol. 68, 747 (1954)

68. Yura, T., Carnegie Inst. Wash. Pub. 612, 62 (1956)

69. Magasanik, B., Ann. Rev. Microbiol. 11, 221 (1957)

70. Stouthamer, A.H., P.G. de Haan und H.J.J. Nijkamp, Genet. Res. 6, 442 (1965)

71. Diorio, A.F. und L.M. Lewin, Fed. Proc. 26, 525 (1967)

72. Diorio, A.F. und L.M. Lewin, J.Biol. Chem. 243, 4006 (1968)

73. Newell, P.C. und R.G. Tucker, Biochem. J. 100, 512 (1966)

74. Newell, P.C. und R.G. Tucker, Biochem. J. 100, 517 (1966)

75. Bonner, J. und J. Erickson, Amer. J. Bot. 25, 685 (1938)

76. Bonner, J. und H. Bonner, Vitam. & Horm. 6, 225 (1948)

77. Nakayama, H., Vitamins (Kyoto) 10, 359 (1956)

78. Plaut, G.W.E., Ann. Rev. Biochem. 30, 409 (1961)

79. Louis, R., Mitt. naturf. Ges. Bern 10, 1 (1951)

80. Tatum, E.L. und T.T. Bell, Amer. J. Bot. 33, 15 (1946)

81. Korte, F., W. Paulus, J. Vögel und H. Weitkamp, Liebigs Ann. 648, 124 (1961)

82. Harington, C.R. und R.C.G. Moggridge, J. Chem. Soc. 1939, 443

83. Harington, C.R. und R.C.G. Moggridge, Biochem. J. 34, 685 (1940)

84. Robbins, W.J., Plant Physiol. 15, 547 (1940)

85. Buchman, E.R. und E.M. Richardson, J. Amer. Chem. Soc. 61, 891 (1939)

86. Hitchcock, C.H.S. und J. Walker, Biochem. J. 80, 137 (1961)

87. Fujii, A., K. Esaki und T. Kawasaki, Vitamins (Kyoto) 36, 40 (1967)

88. Linnett, P.E. und J. Walker, J. Chem. Soc. 1967, 769

89. Agaki, M. und H. Kumaoka, J. Vitaminol. 9, 177 (1963)

90. Kumaoka, H., J. Vitaminol. 9, 188 (1963)

91. Lewin, L.M. und A.F. Diorio, Fed. Proc. 27, 255 (1968)

92. Eberhardt, B.M. und E.L. Tatum, J. Gen. Microbiol. 20, 43 (1959)

93. Moyed, H.S., J. Bacteriol. 88, 1024 (1964)

93a Kawasaki, T., A. Iwashima und Y. Nose, J. Biochem. 65, 407 (1969)

93b Kawasaki, T. und Y. Nose, J. Biochem. 65, 417 (1969)

94. Kawasaki, T., T. Nakata und Y. Nose, J. Bacteriol. 95, 1483 (1968)

95. Sanderson, K.E. und M. Demerec, Genetics 51, 897 (1965)

96. Parada, J.L. und M.V. Ortega, J. Bacteriol. 94, 707 (1967)

97. Mortimer, R.K. und D.C. Hawthorne, Genetics 53, 165 (1966)

98. Barratt, R.W., D. Newmeyer, D.D. Perkins und L. Garnjobst, Advanc. Genet. 5, 1 (1954)

99. Flodin, P., Dextran gels and their applications in gel filtration, Dissertation, Uppsala, Schweden (1962)

100. Moore, S. und W.H. Stein, J. Biol. Chem. 211, 893 (1954)

101. Crampton, C.F., F.R. Frankel, A.M. Benson und A. Wade, Anal. Biochem. 1, 249 (1960)

102. Chandra, P., A. Wacker, R. Süßmuth und F. Lingens, Z. Naturforschg. 22b, 512 (1967)

103. Layne, E., in Colowick, S.P. und N.O. Kaplan, Methods in Enzymology, Band III, S. 450, Academic Press, New York (1957)

104. Dempsey, W.B. und P.F. Pachler, J. Bacteriol. 91, 642 (1966)

105. Bratton, A.C. und E.K. Marshall, Jr., J. Biol. Chem. 128, 537 (1939)

106. Levenberg, B. und J.M. Buchanan, J. Biol. Chem. 224, 1005 (1957)

107. Hartman, S.C., B. Levenberg und J.M. Buchanan, J. Biol. Chem. 221, 1057 (1956)

108. Fiske, C.H. und Y.J. Subbarow, J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)

109. Goebel, W., Dissertation, Tübingen, 1965

110. Determann, H., Gelchromatographie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

111. Determann, H. und I. Walter, Nature 219, 604 (1968)

112. Janson, J.-C., J. Chromatog. 28, 12 (1967)

113. Gelotte, B., J. Chromatog. 3, 330 (1960)

114. Lerner, J. und A.I. Schepartz, J. Chromatog. 39, 132 (1969)

115. Bretthauer, R.K. und A.M. Golichowski, Biochim. Biophys. Acta 155, 549 (1967)

116. Neddermeyer, P.A. und L.B. Rogers, Anal. Chem. 40, 755 (1968)

117. Sweetman, L. und W.L. Nyhan, J. Chromatog. 32, 662 (1968)

118. Marsden, N.V.B., Ann. N.Y. Acad. Sci. 125, 428 (1965)

119. Braun, R., Biochim. Biophys. Acta 142, 267 (1967)

120. Mezzasoma, I. und B. Farina, Boll. Soc. Itl. Biol. Sper. 42, 1449 (1966)

121. Zadrazil, S., Z. Sormova und F. Sorm, Collection czech. chem. Comm. 26, 2643 (1961)

122. Hohn, Th. und W. Pollmann, Z. Naturforschg. 18b, 919 (1963)

123. Gorbach, G. und J. Henke, J. Chromatog. 37, 225 (1968)

124. De Bersaques, J., J. Chromatog. 31, 222 (1967)

125. Love, S.H. und B. Levenberg, Biochim. Biophys. Acta 35, 367 (1959)

126. Love, S.H. und J.S. Gots, J. Biol. Chem. 212, 647 (1955)

127. Levenberg, B. und J.M. Buchanan, J. Am. Chem. Soc. 78, 504 (1956)

128. Buchanan, J.M., J.G. Flaks, S.C. Hartman, B. Levenberg, L.N. Lukens und L. Warren, CIBA Foundation Symposium, The Chemistry and Biology of Purines, S. 233, Brown & Co., Boston (1957)

129. Goldthwait, D.A. und G.R. Greenberg, in Colowick, S.P. und N.O. Kaplan, Methods in Enzymology, Band II, S. 504, Academic Press, New York (1955)

130. Ames, B.N. und H.K. Mitchell, J. Biol. Chem. 212, 687 (1955)

Lebenslauf

Am 12. März 1940 wurde ich in Paderborn als Sohn des Chemikers Dr.-Ing. Wolf Strätling und seiner Ehefrau Lisa, geb. Oeding, geboren. Nach vier Volksschuljahren (1946 - 1950) in Marl (Kreis Recklinghausen) und einem Zwischenjahr (Ausfall durch Krankheit) besuchte ich neun Jahre (1951 - 1960) das Städt. Neusprachl. Gymnasium in Ahlen (Westf.), an dem ich im März 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1960 begann ich an der Universität München das Studium der Biologie, das ich im Sommersemester 1962 an der Universität Tübingen fortsetzte. Nach dem 5. Semester wechselte ich zu dem soeben eingerichteten Biochemiestudium über.

Am 22.10.1963 bestand ich den ersten und am 30.4.1964 den zweiten Teil der Diplomvorprüfung für Biochemiker. Nach meiner Diplomarbeit mit dem Thema "Isolierung und Teilstruktur des Insulins von Myxine glutinosa (Cyclostomata)", die ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel anfertigte, bestand ich am 19.10.1966 die Diplomhauptprüfung für Biochemiker mit dem Wahlfach Pharmakologie. Seither arbeitete ich an meiner Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Lingens.

Meine akademischen Lehrer waren:
Chemie: E.Bayer, F. Lingens, E. Müller, W. Rüdorff
Physikalische Chemie: G. Kortüm, H. Mauser
Biochemie: E. Buddecke, H. Friedrich-Freksa, G. Hillmann, F. Lingens, F. Schneider, G. Schramm, G. Weitzel

Pysik und Mathematik: H. Krüger, W. Schweizer

Biologie und Genetik: A. Egelhaaf, K.G. Grell, H. Metzner, F.P. Möhres

Pharmakologie: F. Lembeck

Physiologie: K. Brecht, P. Pauschinger.

BAMBERGER FOTODRUCK - RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG - Markusplatz 22 - Tel.: 09 51/6 27 94